

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

NOBBE, Matthias
Viering, Jentschura & Partner
Centroallee 263
D-46047 Oberhausen
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 06 décembre 2001 (06.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P 19887	
International application No. PCT/DE00/01950	International filing date (day/month/year) 15 juin 2000 (15.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☐ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address

ACTINODRUG PHARMACEUTICALS GMBH
Neuendorferstrasse 24 a
16761 Hennigsdorf
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person

 ☐ the name

 ☒ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address

ACTINODRUG PHARMACEUTICALS GMBH
Neuendorfstrasse 24 a
16761 Hennigsdorf
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Simin Baharlou

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

NOBBE, Matthias
Viering, Jentschura & Partner
Centroallee 263
D-46047 Oberhausen
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 25 April 2001 (25.04.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P 19887	
International application No. PCT/DE00/01950	International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☐ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address

ACTINODRUG PHARMACEUTICALS GMBH
Neuendorferstrasse 24 a
16761 Henningsdorf
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person

 ☐ the name

 ☐ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Additional applicant for all designated States except US. KELLER, Ullrich stays applicant/inventor for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Simin Baharlou

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

NOBBE, Matthias
Viering, Jentschura & Partner
Centroallee 263
D-46047 Oberhausen
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 25 April 2001 (25.04.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P 19887	
International application No. PCT/DE00/01950	International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address NOBBE, Matthias Viering, Jentschura & Partner Essener Strasse 5 D-46047 Oberhausen Germany	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 49-208-82 90 225	
	Facsimile No. 49-208-80 90 232	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address NOBBE, Matthias Viering, Jentschura & Partner Centroallee 263 D-46047 Oberhausen Germany	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 49-208-81 0 89 00	
	Facsimile No. 49-208-20 5 55 42	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Simin Baharlou Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO;

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

NOBBE, Matthias
Viering, Jentschura & Partner
Centroallee 263
D-46047 Oberhausen
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 12 October 2001 (12.10.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P 19887	
International application No. PCT/DE00/01950	International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address ACTINODRUG PHARMACEUTICALS GMBH Neuendorferstrasse 24 a 16761 Henningsdorf Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address ACTINODRUG PHARMACEUTICALS GMBH Neuendorfstrasse 24 a 16761 Henningsdorf Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Simin Baharlou
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 04 April 2001 (04.04.01)	
International application No. PCT/DE00/01950	Applicant's or agent's file reference P 19887
International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00)	Priority date (day/month/year) 16 June 1999 (16.06.99)
Applicant KELLER, Ullrich et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

12 January 2001 (12.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Deutsches Patent- und Markenamt
Technisches Informationszentrum Berlin

Internationales Anmeldedatum

15. Juni 2000

6

Anl.

Name des Anmeldeamts und des Rechtsanwalts (falls gewünscht)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) KeActinoPat1

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zur Veränderung von Peptidsynthetasen in der Weise, daß sie ihre Substratamino-säuren N-methylieren können

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Keller, Ullrich
Selbitzerstr. 16 c
14089 Berlin
Germany

☒ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

Deutschland

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Deutschland

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☒ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Schauwecker, Florian
Herderstr. 35
12163 Berlin
Germany

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Deutschland

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Deutschland

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☐ Anwalt

☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

PD Dr. Ullrich Keller
Technische Universität Berlin
Max-Volmer-Institut / Abt. Biochemie (Skr. OE2)
Franklinstr. 29
10587 Berlin, Germany

Telefonnr.:

049 - 30 - 31423629

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

☒ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ **AP** ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA** Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP** Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA** OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

☒ und alle diejenigen Länder, die am Anmeldetag dem PCT

☐ beigetreten sind.

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

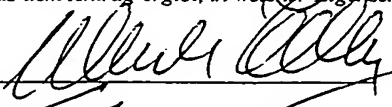
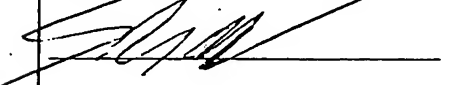
Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 16/06/1999	19928313.3-41	Deutschland		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☒ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE	
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):	Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):
ISA /	Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE	
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:	Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
Antrag : 3	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 14	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Ansprüche : 2	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
Zusammenfassung : 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
Zeichnungen : 7	5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
Sequenzprotokollteil der Beschreibung :	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
Blattzahl insgesamt : 27	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):	8. <input type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
	9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auführen):
	Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: deutsch

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.
 Keller, Ullrich
 Schauwecker, Florian

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG

Anhang zum Antrag

Von Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Eingangsstempel des Anmeldeamts

Aktenzeichen des Anmelders
oder Anwalts KeActinoPat1

Anmelder
Keller, Ulrich

BERECHNUNG DER VORGESCHRIEBENEN GEBÜHREN

1. ÜBERMITTLUNGSGEBÜHR 175,00 DM T

2. RECHERCHENGEBÜHR 1848,26 DM S

Die internationale Recherche ist durchzuführen von
(Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig,
ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll.)

3. INTERNATIONALE GEBÜHR

Grundgebühr

Die internationale Anmeldung enthält 30 Blätter.

umfaßt die ersten 30 Blätter 799,93 DM b1

x 17,60 DM = b2

Anzahl der Blätter Zusatzblattgebühr
über 30

Addieren Sie die in Feld b1 und b2 eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld B ein 799,93 DM B

Bestimmungsgebühren

Die internationale Anmeldung enthält über 8 Bestimmungen.

8 x 172,11 DM = 1376,88 DM D

Anzahl der zu zahlenden Bestimmungsgebühren

(maximal 8)

Addieren Sie die in Feld B und D eingetragenen

Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld I ein 2176,81 DM I

(Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der internationalen Gebühr um 75%.
Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld I einzutragende
Gesamtbetrag 25% der Summe der in Feld B und D eingetragenen Beträge.)

4. GEBÜHR FÜR PRIORITÄTSBELEG (ggf.) 35,00 DM P

5. GESAMTBETRAG DER ZU ZAHLENDEN GEBÜHREN

Addieren Sie die in Feldern T, S, I und P eingetragenen Beträge,

und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein 4235,07 DM

INSGESAMT

☐ Die Bestimmungsgebühren werden jetzt noch nicht gezahlt.

ZAHLUNGSWEISE

☐ Abbuchungsauftrag (siehe unten) ☐ Bankwechsel ☐ Kupons
☐ Scheck ☐ Barzahlung ☒ Sonstige (einzeln angeben):
☐ Postanweisung ☐ Gebührenmarken ÜBERWEISUNG

ABBUCHUNGSAUFTRAG (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Anmeldeämtern)

Das Anmeldeamt/ ☐ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.

☐ (dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Vorschriften des Anmeldeamts über laufende
Konten dieses Verfahren erlauben) wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend
angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.

☐ wird beauftragt, die Gebühr für die Ausstellung des Prioritätsbelegs und seine Übermittlung an das
Internationale Büro der WIPO von meinem laufenden Konto abzubuchen.

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift

THIS PAGE BLANK (USPTO

Verfahren zur Veränderung von Peptidsynthetasen in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können.

Prioritätsanspruch:

frühere Anmeldung:

16. Juni 1999 / Deutschland

früheres Aktenzeichen:

19928313.3 - 41

1 Beschreibung:	14 Seiten	(Seite 1 - 14)
10 Ansprüche:	2 Seiten	(Seite 15 - 16)
1 Zusammenfassung:	1 Seite	(Seite 17)
7 Zeichnungen:	7 Seiten	(Seite 1/7 - 7/7)

Seite 1-B
aus der
Reihe der

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 12 OCT 2001

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 19887	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01950	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 16/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/52		
Anmelder KELLER, Ulrich et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 12/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 10.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Sommer, B Tel. Nr. +49 89 2399 7099 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-14 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-15 eingegangen am 13/09/2001 mit Schreiben vom 13/09/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-2, eingereicht mit Schreiben vom 27.09.2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01950

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).
siehe Beiblatt

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:

- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
- ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.

2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 5 (teilweise); 6, 12-15 (vollständig).

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 12-14 (vollständig) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 5 (teilweise); 6, 15 (vollständig) sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-4, 10, 11 (vollständig); 5 (teilweise)
	Nein: Ansprüche	7-9
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-4, 10, 11 (vollständig); 5 (teilweise)
	Nein: Ansprüche	7-9
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-4, 7-11 (vollständig); 5 (teilweise)
	Nein: Ansprüche	-

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt I

Die Ansprüche 6, 12-15 sowie teilweise Anspruch 5 sind aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der vorläufigen Prüfung:

Die Ansprüche 6 und 15 werden nicht durch die Beschreibung gestützt, da ihr Umfang über den durch die Beschreibung und die Zeichnungen gerechtfertigten Umfang hinausgeht. Anspruch 6 führt zwangsläufig zu einer Verdoppelung von ACP-, Aktivierungs- bzw. Kondensationsdomäne innerhalb eines Moduls. Dieses Merkmal steht jedoch im Widerspruch zu der Offenbarung der Beschreibung. Ebenso werden die Merkmale des Anspruchs 15 in der Spezifikation ausschließlich in Verbindung mit Polypeptidsynthetasen (PPS), nicht jedoch im Zusammenhang mit Polyketidsynthetasen (PKS) genannt.

Die geänderten Ansprüche 12-14 gehen über den Inhalt der ursprünglich eingereichten Fassung der Anmeldung hinaus, da die sehr allgemein gehaltenen Begriffe "Edukt-Verbindung", "Gemisch" und "Produkt-Verbindung" eine unzulässige Verbreiterung der ursprünglich offenbarten Gegenstände (Aminosäuren, Polypeptide, Peptidyl-Acetyl-Mischstrukturen etc.) darstellen.

Im Hinblick auf Anspruch 5 ist eine Stütze in der Beschreibung nur soweit vorhanden, als sich dieser auf die Insertion einer Domäne mit N-Methyltransferaseaktivität mittels zweier Fusionsstellen zwischen Adenylierungs- und ACP-Domäne bezieht. Deshalb wird der Anspruch 5 nur teilweise einer vorläufigen Prüfung unterzogen, wobei der Gegenstand des Anspruchs entsprechend dieser Einschränkung interpretiert wird.

Zu Punkt II

Der vorliegenden Prüfung liegt die Annahme zugrunde, daß alle Ansprüche Prioritätsrechte ab dem Zeitpunkt der Einreichung des Prioritätsdokuments (16.06.1999) genießen.

Zu Punkt V

1. Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: MARAHIEL M A ET AL: 'Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis' CHEMICAL REVIEWS, Bd. 97, Nr. 7, November 1997, Seiten 2651-2673

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Veränderung nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen (PPS), infolgedessen diese ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. Die modular aufgebauten PPS enthalten für jede Aminosäure des Peptidprodukts eine substratspezifische Aktivierungsdomäne. Einige natürlich vorkommende Aktivierungsdomänen besitzen darüber hinaus eine N-Methyltransferase-Aktivität. Die Umwandlung einer Aktivierungsdomäne in eine Aktivierungsdomäne der gleichen Substratspezifität mit zusätzlicher N-Methyltransferase-Aktivität erfolgt durch Insertion von dafür kodierenden DNA-Sequenzen in ein PPS-Gen bzw. durch Austausch der Aktivierungsdomäne. Weiterhin werden die gemäß diesem Verfahren erhältliche DNA, diese DNA enthaltende Zellen, die Verwendung derartiger Sequenzen zur Herstellung von PPS sowie von diesen Sequenzen kodierte Proteine offenbart.
3. Die Ansprüche 7-9 stehen nicht im Einklang mit **Artikel 33(2) PCT**, da ihr Gegenstand nicht neu ist. Ein Produkt, das nach einem bestimmten Verfahren erhältlich ist (hier: DNA bzw. Zelle), wird nicht allein dadurch neu, daß es mit Hilfe eines neuartigen Verfahrens hergestellt wurde. Da eine entsprechend dem offenbarten Verfahren hergestellte DNA kodierend für eine PPS-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität und einer bestimmten Substratspezifität jedoch nicht zwangsläufig von einer DNA kodierend für eine natürlich vorkommende PPS-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität und gleicher Substratspezifität unterscheidbar ist, kann der Gegenstand des Anspruchs 7 und in analoger Weise auch derjenige des Anspruchs 8 nicht als neu betrachtet werden. Gleiches gilt für Anspruch 9, da dieser Anspruch folglich auch die Expression natürlich vorkommender PPS mit N-Methyltransferase-Aktivität in den entsprechenden Organismen umfaßt.

Hingegen erfüllen die Ansprüche 1-4, 5 (teilweise) und 10-11 die Anforderungen des **Artikels 33(2) PCT**, da der Stand der Technik weder die Insertion einer Domäne mit N-Methyltransferase-Aktivität in die kodierende DNA-Sequenz einer PPS-Aktivierungsdomäne ohne diese Aktivität offenbart noch eine gezielte Substitution einer PPS-Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität durch eine entsprechende Domäne mit N-Methyltransferase-Aktivität.

4. Als nächstliegender Stand der Technik zur Bestimmung der erfinderischen Tätigkeit der Ansprüche 1-4, 5 (teilweise), 10 und 11 wird Dokument D1 betrachtet, welches neben der modularen Organisation multifunktionaler PPS mehrere Strategien zur Konstruktion

THIS PAGE BLANK (USPTO)

genetisch veränderter PPS offenbart. Die Module einer PPS enthalten jeweils mehrere Domänen, die offensichtlich unabhängig voneinander agieren, auch wenn sie in einem einzigen Protein lokalisiert sind (D2, Seite 2671, linke Spalte, Zeilen 28-37 und 48-56). So führt beispielsweise die gezielte Substitution einer von Linkern flankierten Aktivierungsdomäne durch eine andere zu einer veränderten Substratspezifität an dieser Position (D2, Abbildung 11; Seite 2669, rechte Spalte, zweiter Absatz). In Modulen mit N-Methyltransferase-Aktivität wurde sowohl im Gen der Cyclosporin A-Synthetase als auch in demjenigen der Enniatin-Synthetase etwa 420 Aminosäuren lange, konservierte Domänen gefunden, welche zwischen der Adenylierungs- und der Thiolbindungseinheit dieser Module lokalisiert sind. Eine derartige Insertion innerhalb der Aktivierungsdomäne korreliert dabei direkt mit einer N-methylierten Aminosäure im Peptidprodukt (D2, Abbildung 3 und 4; Seite 2668, rechte Spalte, erster Absatz).

Es gibt jedoch in den vorliegenden Dokumenten zum Stand der Technik keine unmittelbaren Hinweise darauf, daß eine N-Methyltransferase-Aktivität unter Erhaltung der Substratspezifität gezielt in ein Modul eingefügt werden kann, sei es a) durch Einfügen einer N-Methyltransferase-Domäne in eine Aktivierungsdomäne oder b) durch Substitution der gesamten Aktivierungsdomäne. Aus diesem Grund erfüllen die Ansprüche 1-4, 5 (teilweise), 10 und 11 die Anforderungen des **Artikels 33(3) PCT**.

Zu Punkt VIII

5. Die Definition des Gegenstands der Ansprüche 1-5, 8, 9 und 11 ist aus folgenden Gründen unklar im Sinne von **Artikel 6 PCT**:

Die Verwendung des Ausdrucks "DNA-Fragment" in den Ansprüchen 1-5 verhindert eine klare Definition und ist nicht geeignet, den Umfang dieser Ansprüche zu bestimmen. Ohne eine genaue Angabe von Länge bzw. Sequenz der genannten Teile bleibt dieser Ausdruck vage und zweideutig. Ebenso ist es unmöglich, die in den Ansprüchen 1-5 und 11 genannten PPS-Untereinheiten (N-Methylierungsdomänen, Aktivierungsdomänen, etc.) genau zu identifizieren. Eine DNA bzw. ein Gen oder ein Protein muß als chemische Substanz angesehen werden, das in einem Patentanspruch eindeutig durch Bezugnahme auf technische Merkmale, z.B. auf seine Sequenz, oder ausnahmsweise als Produkt eines Verfahrens zu definieren ist und nicht durch die bloße

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Angabe seiner Funktion bzw. durch das zu erreichende Ergebnis.

Aus der Beschreibung (siehe Seite 3, Zeilen 8-16 sowie Abbildung 2) geht hervor, daß die Position, an der die N-Methyltransferase-Domäne eingefügt wird, für die Definition der Erfindung wesentlich ist. Da die unabhängigen Ansprüche 1-3 dieses Merkmal nicht enthalten, entsprechen sie nicht dem Erfordernis des **Artikels 6 PCT** in Verbindung mit **Regel 6.3 b) PCT**, demzufolge jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.

Der Anspruch 8 wird nur teilweise, wie in **Artikel 6 PCT** vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt. Eine ausreichende Offenbarung liegt nur für aus Mikroorganismen stammende Zellen vor, nicht jedoch für Zellen anderen Ursprungs.

Im Anspruch 9 wird der Gegenstand nicht durch ein technisches Merkmal definiert, sondern durch ein zu erreichendes Ergebnis, d.h. ganz allgemein durch die Expression einer DNA. Die Beschreibung (siehe Seite 3, Zeile 18 - Seite 4, Zeile 7) vermittelt jedoch den Eindruck, daß die Expression der modifizierten PPS nur in speziellen Organismen ausgeführt werden kann, und daß keine Alternativen dazu vorgesehen sind. Somit wird der Anspruch 9 nicht, wie in **Artikel 6 PCT** vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/DE00/01950

ActinoDrug Pharamceuticals GmbH

Neue Patentansprüche:

5

1. Verfahren zur Herstellung einer für eine Polypeptidsynthetase (PPS)-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferaseaktivität kodierenden rekombinanten DNA, wobei ein für eine Domäne mit N-Methyltransferaseaktivität
10 kodierendes erstes DNA-Fragment in ein zweites, für eine PPS-Aktivierungsdomäne ohne Methyltransferaseaktivität kodierendes DNA-Fragment kloniert wird und das erste und zweite DNA-Fragment einen durchgehenden Leserahmen bilden.

15 2. Verfahren zur Herstellung einer für eine PPS mit N-Methyltransferaseaktivität kodierenden rekombinanten DNA, wobei das erste DNA-Fragment nach Anspruch 1 in ein zweites, für eine PPS mit einer Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferaseaktivität kodierendes DNA-Fragment in den
20 für die Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferaseaktivität kodierenden DNA-Abschnittes kloniert wird und beide DNA-Fragmente einen durchgehenden Leserahmen bilden.

25 3. Verfahren zur Herstellung einer für eine PPS mit N-Methyltransferaseaktivität kodierenden rekombinanten DNA, wobei ein für eine Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferaseaktivität kodierendes DNA-Fragment eines Gens einer PPS gegen die nach Anspruch 1 erhaltene rekombinante DNA oder gegen ein DNA-Fragment, welches für
30 eine natürliche Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferaseaktivität kodiert, unter Gewinnung eines durchgehenden Leserahmens ausgetauscht wird.

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das für eine Domäne mit N-Methyltransferaseaktivität kodierende DNA-Fragment zwischen den für die Adenylierungsdomäne und den für die die ACP-Domäne kodierenden DNA-Abschnitten einer PPS-Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferaseaktivität mittels einer singulären Fusionsstelle kloniert wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das für eine Domäne mit N-Methyltransferaseaktivität kodierende DNA-Fragment mittels zweier Fusionsstellen kloniert wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei das für eine Domäne mit N-Methyltransferaseaktivität kodierende DNA-Fragment zusätzlich für eine ACP-, Aktivierungs- oder Kondensationsdomäne kodiert.

7. DNA, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6.

8. Zelle, enthaltend mindestens eine DNA nach Anspruch 7.

9. Verfahren zur Herstellung einer PPS mit N-Methyltransferaseaktivität, wobei die nach einem der Ansprüche 2-6 erhaltene, für eine PPS mit N-Methyltransferase kodierende DNA exprimiert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die PPS auf einem Plasmid kodiert ist und die Expression in einem Mikroorganismus erfolgt.

11. PPS mit N-Methyltransferaseaktivität, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 9-10.

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12. Verwendung der PPS nach Anspruch 11 zur katalytischen Einwirkung auf eine Edukt-Verbindung oder ein Gemisch derselben.

- 5 13. Produkt-Verbindung, erhältlich durch katalytische Einwirkung der PPS nach Anspruch 12 auf eine Edukt-Verbindung oder ein Gemisch derselben.

- 10 14. Verwendung der Produkt-Verbindung nach Anspruch 13 zum Test auf deren pharmakologische Wirksamkeit.

15. Verwendung der DNA nach Anspruch 7 zur Herstellung rekombinanter PKS-Gene oder rekombinanten Genabschnitten dieser.

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Keller Dr., Ullrich

<120> Verfahren zur Veraenderung von Peptidsynthetasen in der Weise, dass sie ihre Substrataminosaeuren N-methylieren koennen

<130> KeActinoPat1

<140> PCT/DE00/01950

<141> 2000-06-15

<150> DE-19928313.3-41

<151> 1999-06-16

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3849

<212> DNA

<213> Streptomyces chrysomallus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3849)

<400> 1

```
ggatccacct gctcgacacc gccaccgccc aacccgagca gcccctcagc cgcacgcgacg 60
tcctcaccccc ggaggagagg aaccgcacga tcgtcgaggt caaccggacc gaactgccgc 120
tgcccgcacgc ctcggttgcg gagctgttcg aacaacaggt gaccctcaca cccgacgccc 180
ccgccctggt cagcgacggc gccacgctca gctactccga gctcaacacg cgcgccaaacc 240
acctcgccca ccagctcacc acccggggca tccgccccgg cgacgcgcgc gccgtcctcc 300
tccaacgctc ccccgacacc gtcaccaccg tcctcgccct cgccaagacc ggcgcgacct 360
acatccccct cgacagccgc taccgcgcgc accgctaccg cctcgctcctc gacgagaccc 420
gcaccaaact cctcatcacc gaccacacca ccgacctcga caccaccaca acccagttca 480
accccgccga cacccccac gacggcgaag accccggcaa cccgaaccac accacccacc 540
ccgacgacgc cgcctacatc atgtacacca gcggctccac cggccgcccc aagggcgta 600
tcgccaccca ccgcaacatc accgcccctg ccctcgaccc ccgcttcgac cccaccgccc 660
accgcccgcg cctcctccac tccccaccg ccttcgacgc ctccacctac gagatctggg 720
tccccctcct caacggcaac accgtcgtec tcgccccac cggcgacctc gacgtccaca 780
cctaccaccg cgtcatcacc gaccagcaga tcaccgccct ctggctgacc agctgggtct 840
tcaacctcct caccgagcag agcccggaga ccttcacccg ggtccggcag atctggaccg 900
gcgggcgaggc cgtctccggc gccaccgtca cccggcttca gcaggcatgc cccgacacca 960
ccgtggtcga cggctacggc cccaccgaga ccaccacctt cgccaccac caccocgtcc 1020
ccacccccta caccggtcc gccgtcgtec ccatcgccg ccccatggcc accatgcaca 1080
cctacgtgct cgacgacagc ctccagcccg tcgcccccg cgtcaccggc gagctctacc 1140
tcgttggaag cggcctcgcc cgcggctacc tggaccgccc cgccctcacc gccgaacgt 1200
tcgtcgccaa cccgtacgcc gcaccggag aacgcatgta ccgaccggc gacctggcac 1260
gctggaaccc cgacgaccac ctcgagtac cggcgccgc cgaccaccag gtcaaggctc 1320
gcggtcttcg catcgaaccc ggcgagatcg agaacgtcct caccgacct cccgcgctcg 1380
cccaggccgc cgtccacctc aaccgggacc agcccggcaa ccccggctc gtcgcgtacg 1440
tcgtcgcgga cacctcgcg ccgagcagcg atgtggacca gcagcaccag atcggcgagt 1500
ggcaggacct ctacgactcc ctctacgcg cccccacggc cgagttcggc gaggacttct 1560
ccggctggaa cagcagctac gacggccggc cgatccccct cgaccagatg cgggagtggc 1620
gcgacgccac cgtggaacgc atccgcggc tcaaccgcg ccgggtgctg gagatcgcg 1680
tcggcacggg cctgctgctc gcgaagctgg ccccgagtg cgaggagtac tggggcacgg 1740
acctctcgcc caccgtgatc gaggcgctct cccggcacgt cgacgccgac ccggagctgg 1800
cccggcgggt caccctcgcg gccggtgccg cgcacgagca cgaggggctg cccgtcggcc 1860
acttcgacac cgtcgtgctc aactccgtgg tcagtaact cccgaacgcc gactacctcg 1920
cccaggtcat cgagcaggcg ctgcggctgc tggccccgg cggcgccgtg ttcacggcg 1980
```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2

acatccgcaa	cccgcggctg	ctgcgcacct	tcaccaccgc	cgtccagacc	gcccgcgcgg	2040
aggacccggc	cgacaccgcc	gccgtgcggc	gcgcgcgcga	gcagagcctg	gtgctggaga	2100
aggaaactcct	ggtegacccg	gagtacttca	ccgcgcctac	ccaccgcctc	ccggacctcg	2160
ccggcgtcga	cctgcggctc	aagtgcggcg	ccgcccacaa	cgagttgacc	cgctaccgct	2220
acgacaccac	gctccacaag	gccggaatca	ccgcgcctcc	gctgtccgag	gccgcgctcc	2280
tggcctggcc	gcaggacgcc	gaggcactcg	cccggcacct	ggccgaggcc	cgcccgagac	2340
ggctgcgcgt	caccggcgcg	cccaactccc	ggatagccgc	cgacctcgcg	gcccagcacg	2400
ccctggagtc	cggcaccgcc	ccggccgggc	ccccgaccgg	gccctacgcc	acggagcagc	2460
cggacctcga	ggcactccac	cgcctcgggg	aggaccacgg	gtactggacg	gccgtcacct	2520
ggtccgcccc	ccgccccgac	accgtcgacc	tcacctctgt	ccggcgcggc	ctgctcgacg	2580
gcgcgcgtccc	ggtcggtacg	tacgccccgg	cgccgcgcgg	cgacccggcg	acgccgctca	2640
ccgccttcac	caccaacccc	gtcggcagcc	ggggcaccgc	cgcgctgctc	accgcgctgc	2700
gcgaacacgc	cgccgcccac	ctgcccgcgt	acatgcggcc	cgccgcaatc	gtcccgcctc	2760
accgcctgcc	gctcacgcgc	aacggcaagc	tcgaccgggc	cgccctcccc	gcactcgacc	2820
cggagcacgc	ggacaccggc	cgccgcccc	ggacgcgcga	ggagcagggt	gtctgcgagc	2880
tgttcgcgga	ggtgctcggc	cggccgctcg	tcggtgtgga	ccaggacttc	ttcgacctcg	2940
gcggggcactc	gctgctcgcc	acccggctga	tcgcccggct	gcgcgcgcgc	ttcggcgtgg	3000
aactgggcct	gcgcagcctc	ttcgaggcgc	cgacgcgcgg	cgggatcgcc	gcccggctgg	3060
acctcgacga	cccggacggc	tcctacgagg	tgggtgctgc	gctgcgcgcc	cagggcagca	3120
ggccgcccgt	gttctgcatc	caccccggtg	gcggcatcag	ctggctgtac	agcgcgctga	3180
tcaagcacct	cggcccggag	taccgcgtgt	acggcatcca	ggcgcgcagc	ctggcccgc	3240
cggagccgcg	gccggagagc	atcgaggaga	tggcggtgga	ctacgccgac	cagatccagg	3300
gcgtgcagcc	gcacggcccc	taccacctgg	ccggctggtc	gttcggcggg	ctgtgcgccc	3360
atgccctggc	cgcgaggttc	cagcggcgcg	gcgagccggt	ggcgtggtc	gcggtgctcg	3420
atgtgatccc	gaactggcag	gggctcacc	acgacgacgt	cccggccccc	gacgaccggg	3480
tgatgctgct	gtaccacgtc	ggcctggctg	acgacggcag	ccaccgcaac	gaccgcgaag	3540
agctgacctt	cgccaggggc	cgcgagatcc	tgcgcgcgca	gggcagtggt	ctcgccaacc	3600
tggaggagga	ccggctcacc	acgatcaccg	agatctcggc	caacaacacc	catctgaccg	3660
tcgactacca	gcccggcccc	atcgacggcg	acctgctgct	gatcgccgcc	tcggaacagc	3720
aggacccgcc	ggtcaccgcc	gatgcctggc	ggccgtacgt	ctgcggcgcg	gtcgaggccc	3780
acgtggtgcc	cggcgagcac	ggctccatgc	tgacccggcc	cggcacctcg	gcccagatcg	3840
gcgggatcc						3849

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

NOBBE, Matthias
VIERING, JENTSCHURA & PARTNER
Essener Strasse 5
46047 Oberhausen
ALLEMAGNE

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

11.06.2001

NV 11/11/2001

Absendedatum

(Tag/Monat/Jahr)

10.10.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

P 19887

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE00/01950

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)

15/06/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)

16/06/1999

Anmelder

KELLER, Ullrich et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

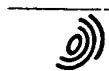
4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Hingel, W

Tel. +49 89 2399-8717





THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P 19887	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01950	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 16/06/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/52		
Anmelder KELLER, Ulrich et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des BerichtsII <input checked="" type="checkbox"/> PrioritätIII <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche AnwendbarkeitIV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der ErfindungV <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser FeststellungVI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte UnterlagenVII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen AnmeldungVIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung		
Datum der Einreichung des Antrags 12/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 10.10.2001	
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Sommer, B Tel. Nr. +49 89 2399 7099 	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-14 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-15 eingegangen am 13/09/2001 mit Schreiben vom 13/09/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-2, eingereicht mit Schreiben vom 27.09.2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01950

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).
siehe Beiblatt

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:
- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
 - ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:
- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
 - ☒ Ansprüche Nr. 5 (teilweise); 6, 12-15 (vollständig).

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 12-14 (vollständig) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 5 (teilweise); 6, 15 (vollständig) sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-4, 10, 11 (vollständig); 5 (teilweise)
	Nein: Ansprüche	7-9
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-4, 10, 11 (vollständig); 5 (teilweise)
	Nein: Ansprüche	7-9
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-4, 7-11 (vollständig); 5 (teilweise)
	Nein: Ansprüche	-

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt I

Die Ansprüche 6, 12-15 sowie teilweise Anspruch 5 sind aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der vorläufigen Prüfung:

Die Ansprüche 6 und 15 werden nicht durch die Beschreibung gestützt, da ihr Umfang über den durch die Beschreibung und die Zeichnungen gerechtfertigten Umfang hinausgeht. Anspruch 6 führt zwangsläufig zu einer Verdoppelung von ACP-, Aktivierungs- bzw. Kondensationsdomäne innerhalb eines Moduls. Dieses Merkmal steht jedoch im Widerspruch zu der Offenbarung der Beschreibung. Ebenso werden die Merkmale des Anspruchs 15 in der Spezifikation ausschließlich in Verbindung mit Polypeptidsynthetasen (PPS), nicht jedoch im Zusammenhang mit Polyketidsynthetasen (PKS) genannt.

Die geänderten Ansprüche 12-14 gehen über den Inhalt der ursprünglich eingereichten Fassung der Anmeldung hinaus, da die sehr allgemein gehaltenen Begriffe "Edukt-Verbindung", "Gemisch" und "Produkt-Verbindung" eine unzulässige Verbreiterung der ursprünglich offenbarten Gegenstände (Aminosäuren, Polypeptide, Peptidyl-Acetyl-Mischstrukturen etc.) darstellen.

Im Hinblick auf Anspruch 5 ist eine Stütze in der Beschreibung nur soweit vorhanden, als sich dieser auf die Insertion einer Domäne mit N-Methyltransferaseaktivität mittels zweier Fusionsstellen zwischen Adenylierungs- und ACP-Domäne bezieht. Deshalb wird der Anspruch 5 nur teilweise einer vorläufigen Prüfung unterzogen, wobei der Gegenstand des Anspruchs entsprechend dieser Einschränkung interpretiert wird.

Zu Punkt II

Der vorliegenden Prüfung liegt die Annahme zugrunde, daß alle Ansprüche Prioritätsrechte ab dem Zeitpunkt der Einreichung des Prioritätsdokuments (16.06.1999) genießen.

Zu Punkt V

1. Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: MARAHIEL M A ET AL: 'Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis' CHEMICAL REVIEWS, Bd. 97, Nr. 7, November 1997, Seiten 2651-2673

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Veränderung nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen (PPS), infolgedessen diese ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. Die modular aufgebauten PPS enthalten für jede Aminosäure des Peptidprodukts eine substratspezifische Aktivierungsdomäne. Einige natürlich vorkommende Aktivierungsdomänen besitzen darüber hinaus eine N-Methyltransferase-Aktivität. Die Umwandlung einer Aktivierungsdomäne in eine Aktivierungsdomäne der gleichen Substratspezifität mit zusätzlicher N-Methyltransferase-Aktivität erfolgt durch Insertion von dafür kodierenden DNA-Sequenzen in ein PPS-Gen bzw. durch Austausch der Aktivierungsdomäne. Weiterhin werden die gemäß diesem Verfahren erhältliche DNA, diese DNA enthaltende Zellen, die Verwendung derartiger Sequenzen zur Herstellung von PPS sowie von diesen Sequenzen kodierte Proteine offenbart.
3. Die Ansprüche 7-9 stehen nicht im Einklang mit **Artikel 33(2) PCT**, da ihr Gegenstand nicht neu ist. Ein Produkt, das nach einem bestimmten Verfahren erhältlich ist (hier: DNA bzw. Zelle), wird nicht allein dadurch neu, daß es mit Hilfe eines neuartigen Verfahrens hergestellt wurde. Da eine entsprechend dem offenbarten Verfahren hergestellte DNA kodierend für eine PPS-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität und einer bestimmten Substratspezifität jedoch nicht zwangsläufig von einer DNA kodierend für eine natürlich vorkommende PPS-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität und gleicher Substratspezifität unterscheidbar ist, kann der Gegenstand des Anspruchs 7 und in analoger Weise auch derjenige des Anspruchs 8 nicht als neu betrachtet werden. Gleiches gilt für Anspruch 9, da dieser Anspruch folglich auch die Expression natürlich vorkommender PPS mit N-Methyltransferase-Aktivität in den entsprechenden Organismen umfaßt.

Hingegen erfüllen die Ansprüche 1-4, 5 (teilweise) und 10-11 die Anforderungen des **Artikels 33(2) PCT**, da der Stand der Technik weder die Insertion einer Domäne mit N-Methyltransferase-Aktivität in die kodierende DNA-Sequenz einer PPS-Aktivierungsdomäne ohne diese Aktivität offenbart noch eine gezielte Substitution einer PPS-Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität durch eine entsprechende Domäne mit N-Methyltransferase-Aktivität.

4. Als nächstliegender Stand der Technik zur Bestimmung der erfinderischen Tätigkeit der Ansprüche 1-4, 5 (teilweise), 10 und 11 wird Dokument D1 betrachtet, welches neben der modularen Organisation multifunktionaler PPS mehrere Strategien zur Konstruktion

THIS PAGE BLANK (USPTO)

genetisch veränderter PPS offenbart. Die Module einer PPS enthalten jeweils mehrere Domänen, die offensichtlich unabhängig voneinander agieren, auch wenn sie in einem einzigen Protein lokalisiert sind (D2, Seite 2671, linke Spalte, Zeilen 28-37 und 48-56). So führt beispielsweise die gezielte Substitution einer von Linkern flankierten Aktivierungsdomäne durch eine andere zu einer veränderten Substratspezifität an dieser Position (D2, Abbildung 11; Seite 2669, rechte Spalte, zweiter Absatz). In Modulen mit N-Methyltransferase-Aktivität wurde sowohl im Gen der Cyclosporin A-Synthetase als auch in demjenigen der Enniatin-Synthetase etwa 420 Aminosäuren lange, konservierte Domänen gefunden, welche zwischen der Adenylierungs- und der Thiolbindungseinheit dieser Module lokalisiert sind. Eine derartige Insertion innerhalb der Aktivierungsdomäne korreliert dabei direkt mit einer N-methylierten Aminosäure im Peptidprodukt (D2, Abbildung 3 und 4; Seite 2668, rechte Spalte, erster Absatz).

Es gibt jedoch in den vorliegenden Dokumenten zum Stand der Technik keine unmittelbaren Hinweise darauf, daß eine N-Methyltransferase-Aktivität unter Erhaltung der Substratspezifität gezielt in ein Modul eingefügt werden kann, sei es a) durch Einfügen einer N-Methyltransferase-Domäne in eine Aktivierungsdomäne oder b) durch Substitution der gesamten Aktivierungsdomäne. Aus diesem Grund erfüllen die Ansprüche 1-4, 5 (teilweise), 10 und 11 die Anforderungen des **Artikels 33(3) PCT**.

Zu Punkt VIII

5. Die Definition des Gegenstands der Ansprüche 1-5, 8, 9 und 11 ist aus folgenden Gründen unklar im Sinne von **Artikel 6 PCT**:

Die Verwendung des Ausdrucks "DNA-Fragment" in den Ansprüchen 1-5 verhindert eine klare Definition und ist nicht geeignet, den Umfang dieser Ansprüche zu bestimmen. Ohne eine genaue Angabe von Länge bzw. Sequenz der genannten Teile bleibt dieser Ausdruck vage und zweideutig. Ebenso ist es unmöglich, die in den Ansprüchen 1-5 und 11 genannten PPS-Untereinheiten (N-Methylierungsdomänen, Aktivierungsdomänen, etc.) genau zu identifizieren: Eine DNA bzw. ein Gen oder ein Protein muß als chemische Substanz angesehen werden, das in einem Patentanspruch eindeutig durch Bezugnahme auf technische Merkmale, z.B. auf seine Sequenz, oder ausnahmsweise als Produkt eines Verfahrens zu definieren ist und nicht durch die bloße

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Angabe seiner Funktion bzw. durch das zu erreichende Ergebnis.

Aus der Beschreibung (siehe Seite 3, Zeilen 8-16 sowie Abbildung 2) geht hervor, daß die Position, an der die N-Methyltransferase-Domäne eingefügt wird, für die Definition der Erfindung wesentlich ist. Da die unabhängigen Ansprüche 1-3 dieses Merkmal nicht enthalten, entsprechen sie nicht dem Erfordernis des **Artikels 6 PCT** in Verbindung mit **Regel 6.3 b) PCT**, demzufolge jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.

Der Anspruch 8 wird nur teilweise, wie in **Artikel 6 PCT** vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt. Eine ausreichende Offenbarung liegt nur für aus Mikroorganismen stammende Zellen vor, nicht jedoch für Zellen anderen Ursprungs.

Im Anspruch 9 wird der Gegenstand nicht durch ein technisches Merkmal definiert, sondern durch ein zu erreichendes Ergebnis, d.h. ganz allgemein durch die Expression einer DNA. Die Beschreibung (siehe Seite 3, Zeile 18 - Seite 4, Zeile 7) vermittelt jedoch den Eindruck, daß die Expression der modifizierten PPS nur in speziellen Organismen ausgeführt werden kann, und daß keine Alternativen dazu vorgesehen sind. Somit wird der Anspruch 9 nicht, wie in **Artikel 6 PCT** vorgeschrieben, durch die Beschreibung gestützt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

JC13 Rec'd PCT/PTO 14 DEC 2001

1

PCT/DE00/01950

ActinoDrug Pharamceuticals GmbH

Neue Patentansprüche:

5

1. Verfahren zur Herstellung einer für eine Polypeptidsynthetase (PPS)-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferaseaktivität kodierenden rekombinanten DNA, wobei ein für eine Domäne mit N-Methyltransferaseaktivität kodierendes erstes DNA-Fragment in ein zweites, für eine PPS-Aktivierungsdomäne ohne Methyltransferaseaktivität kodierendes DNA-Fragment kloniert wird und das erste und zweite DNA-Fragment einen durchgehenden Leserahmen bilden.

15

2. Verfahren zur Herstellung einer für eine PPS mit N-Methyltransferaseaktivität kodierenden rekombinanten DNA, wobei das erste DNA-Fragment nach Anspruch 1 in ein zweites, für eine PPS mit einer Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferaseaktivität kodierendes DNA-Fragment in den für die Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferaseaktivität kodierenden DNA-Abschnittes kloniert wird und beide DNA-Fragmente einen durchgehenden Leserahmen bilden.

20

3. Verfahren zur Herstellung einer für eine PPS mit N-Methyltransferaseaktivität kodierenden rekombinanten DNA, wobei ein für eine Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferaseaktivität kodierendes DNA-Fragment eines Gens einer PPS gegen die nach Anspruch 1 erhaltene rekombinante DNA oder gegen ein DNA-Fragment, welches für eine natürliche Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferaseaktivität kodiert, unter Gewinnung eines durchgehenden Leserahmens ausgetauscht wird.

25

30

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12. Verwendung der PPS nach Anspruch 11 zur katalytischen Einwirkung auf eine Edukt-Verbindung oder ein Gemisch derselben.

5 13. Produkt-Verbindung, erhältlich durch katalytische Einwirkung der PPS nach Anspruch 12 auf eine Edukt-Verbindung oder ein Gemisch derselben.

10 14. Verwendung der Produkt-Verbindung nach Anspruch 13 zum Test auf deren pharmakologische Wirksamkeit.

15. Verwendung der DNA nach Anspruch 7 zur Herstellung rekombinanter PKS-Gene oder rekombinanten Genabschnitten dieser.

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN
z.H. PD Dr. KELLER, Ullrich.
MAX-VOLMER-INSTITUT / ABT. BIOCHEMI
E (Sokr. OE2) FRANKLINSTR. 29
10587 BERLIN
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

14. Dez 2000
(Regel 44.1 PCT)

14/Febr/2001 uol. u
NV 14/10/2001 uol. u

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

13/12/2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

KeActinoPat1

P19887

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/ 01950

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

15/06/2000

Anmelder

KELLER, Ullrich.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsbüro dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von 18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90^{bis} 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von 20 Monaten seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsbüro vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswählerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mireille Claudepierre

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen; außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

14. Dez 2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts KeActinoPat1	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 01950	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/06/2000.	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/06/1999
Anmelder KELLER ,Ulrich.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld III

WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Auf Linie 1. nach "synthetisieren." streichen : "Die von" bis Linie 3.
"Interesse"

Auf Linie 10. nach "bleibt." bis Ende.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/52 C12N15/54 C12N15/62 C12N9/10 C12P13/04
C12P21/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 789 078 A (ENIRICERCH SPA) 13. August 1997 (1997-08-13) Seite 2, Zeile 27,28 Seite 3, Zeile 57-59 Ansprüche 1,3,4 ---	1-10
A	EP 0 637 630 A (ENIRICERCH SPA) 8. Februar 1995 (1995-02-08) Seite 4, Zeile 44 -Seite 5, Zeile 3; Abbildung 3 Anspruch 1 ---	1-10
A	EP 0 578 616 A (SANDOZ LTD ;SANDOZ AG (DE)) 12. Januar 1994 (1994-01-12) Seite 1, Zeile 13-16 Seite 4, Zeile 15-17; Beispiel 7 Ansprüche 12,13 --- -/-	1-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van de Kamp, M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 02659 A (STEMPFER GUENTHER ;BIOCHEMIE GMBH (AT); SCHOERGENDORFER KURT (AT);) 21. Januar 1999 (1999-01-21) Seite 6, Zeile 7-10 Ansprüche 1-3,5,6,10 ---	1-10
A	SCHNEIDER A ET AL: "Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 257, Nr. 3, Februar 1998 (1998-02), Seiten 308-318, XP002141778 Zusammenfassung ---	1-4
A	SCHAUWECKER F ET AL.: "Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from Streptomyces chrysomallus and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 180, Nr. 9, Mai 1998 (1998-05), Seiten 2468-2474, XP002153252 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1-4
A	KELLER U: "Actinomycin synthetases. Multifunctional enzymes responsible for the synthesis of the peptide chains of actinomycin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 262, Nr. 12, 25. April 1987 (1987-04-25), Seiten 5852-5856, XP002153253 Zusammenfassung ---	1-4
A	BURMESTER J ET AL: "Highly conserved N- methyltransferases as an integral part of peptide synthetases." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, Bd. 37, Nr. 2, Oktober 1995 (1995-10), Seiten 201-207, XP000965322 Zusammenfassung ---	1-10
A	BILLICH A ET AL.: "Formation of N-methylated peptide bonds in peptides and peptidols" BIOCHEM. PEPT. ANTIBIOT. (EDITOR(S): KLEINKAUF H; VON DOEHRN H.) PUBL: DE GRUYTER, BERLIN, FED. REP. GER. , 1990, Seiten 57-59, XP000965466 das ganze Dokument --- -/--	1-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MARAHIEL M A ET AL: "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis" CHEMICAL REVIEWS, Bd. 97; Nr. 7, November 1997 (1997-11), Seiten 2651-2673, XP002133489 Seite 2668, Absatz V.B Seite 2669, Absatz VI -Seite 2671, Absatz VII ---	1-10
P,X	SCHAUWECKER F ET AL.: "Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides" CHEMISTRY AND BIOLOGY, Bd. 7, Nr. 4, 20. März 2000 (2000-03-20), Seiten 287-297, XP000957461 das ganze Dokument -----	1-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01950

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0789078	A	13-08-1997	IT	MI951764 A	10-02-1997
			US	5795738 A	18-08-1998
EP 0637630	A	08-02-1995	IT	1264712 B	04-10-1996
			JP	7147978 A	13-06-1995
			US	5652116 A	29-07-1997
EP 0578616	A	12-01-1994	AT	398434 B	27-12-1994
			AT	398578 B	27-12-1994
			AT	43793 A	15-04-1994
			JP	6225773 A	16-08-1994
			US	5827706 A	27-10-1998
			AT	140392 A	15-05-1994
WO 9902659	A	21-01-1999	AU	8631198 A	08-02-1999
			EP	0994943 A	26-04-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09. April 2001

ET DES

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



FRIST:



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/77220 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/52,
15/54, 15/62, 9/10, C12P 13/04, 21/02

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: KELLER, Ullrich [DE/DE]; Selbiterstr. 16 c,
D-14089 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01950

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHAUWECKER,
Florian [DE/DE]; Herderstr. 35, D-12163 Berlin (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Juni 2000 (15.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: NOBBE, Matthias; Viering, Jentschura & Part-
ner, Essener Strasse 5, D-46047 Oberhausen (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 28 313.3 16. Juni 1999 (16.06.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,

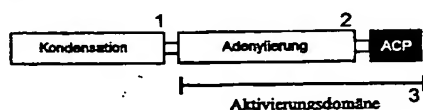
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD OF MODIFYING PEPTIDE SYNTHETASES SUCH THAT THEY CAN N-METHYLATE THEIR SUB-
STRATE AMINO ACIDS

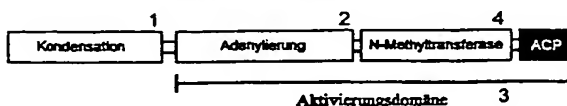
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VERÄNDERUNG VON PEPTIDSYNTHETASEN IN DER WEISE, DASS SIE IHRE
SUBSTRATAMINOSÄUREN N-METHYLIEREN KÖNNEN

Abbildung 1: Modul einer PPS und Unterteilung in funktionelle Domänen
MODULE OF A PPS AND SUBDIVISION INTO FUNCTIONAL DOMAINS

A: Minimal-Modul einer PPS



B: Modul mit N-Methyltransferase-Domäne



A: MINIMAL MODULE OF A PPS

1...CONDENSATION

2...ADENYLATION

3...ACTIVATION DOMAIN

B: MODULE WITH N-METHYL TRANSFERASE DOMAIN

4...N-METHYL TRANSFERASE

(57) Abstract: The invention relates to a method of modifying peptide synthetases in such a manner that they can N-methylate their substrate amino acids. PPS are enzymes that synthesize peptides in a non-ribosomal manner. PPS have a modular set-up. Each module has an activation domain which recognizes and covalently binds to the respective substrate amino acid. The peptide synthesis catalyzed by PPS proceeds by the condensation of the covalently bound substrate amino acids. A minor number of the known activation domains is capable of also N-methylating the bound substrate amino acids. The inventive method allows conversion of the activation domains without N-methyl transferase activity to activation domains with N-methyl transferase activity while maintaining the original substrate specificity.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/77220 A3



HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

29. März 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Veränderung von Peptidsynthetasen (PPS) in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. PPS sind Enzyme, die Peptide auf nicht-ribosomale Weise synthetisieren. Die PPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul besitzt eine Aktivierungsdomäne, welche die jeweilige Substrataminosäure erkennt und kovalent bindet. Die von der PPS katalysierte Peptidsynthese erfolgt dann durch die Kondensation der kovalent gebundenen Substrataminosäuren. Eine geringe Anzahl der bekannten Aktivierungsdomänen ist in der Lage, die gebundenen Substrataminosäuren auch zu N-methylieren. Die hier beschriebene Erfindung ermöglicht die Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsolomänen zu N-Methyltransferase-Aktivität, wobei die ursprüngliche Substratspezifität erhalten bleibt.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/77220 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/52, 15/54, 15/62, 9/10, C12P 13/04, 21/02
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01950
- (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juni 2000 (15.06.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 28 313.3 16. Juni 1999 (16.06.1999) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: KELLER, Ullrich [DE/DE]; Selbitzerstr. 16 c, D-14089 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHAUWECKER, Florian [DE/DE]; Herderstr. 35, D-12163 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: NOBBE, Matthias; Viering, Jentschura & Partner, Essener Strasse 5, D-46047 Oberhausen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,

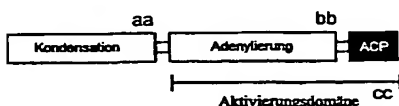
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD OF MODIFYING PEPTIDE SYNTHETASES SUCH THAT THEY CAN N-METHYLATE THEIR SUBSTRATE AMINO ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VERÄNDERUNG VON PEPTIDSYNTHETASEN IN DER WEISE, DASS SIE IHRE SUBSTRATAMINOSÄUREN N-METHYLIEREN KÖNNEN

Abbildung 1: Modul einer PPS und Unterteilung in funktionelle Domänen

A: Minimal-Modul einer PPS



B: Modul mit N-Methyltransferase-Domäne

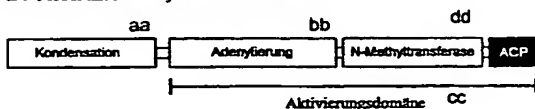


FIGURE 1: MODULE OF A PPS AND
SUBDIVISION INTO FUNCTIONAL DOMAINS

A: MINIMAL MODULE OF A PPS

aa...CONDENSATION

bb...ADENYLATION

cc...ACTIVATION DOMAIN

B: MODULE WITH N-METHYL TRANSFERASE DOMAIN

dd...N-METHYL TRANSFERASE

(57) Abstract: The invention relates to a method of modifying peptide synthetases in such a manner that they can N-methylate their substrate amino acids. PPS are enzymes that synthesize peptides in a non-ribosomal manner. The peptides synthesized by PPS (or the derivatives originating therefrom) are often of pharmaceutical value. PPS have a modular set-up. Each module has an activation domain which recognizes and covalently binds to the respective substrate amino acid. The peptide synthesis catalyzed by PPS proceeds by the condensation of the covalently bound substrate amino acids. A minor number of the known activation domains is capable of also N-methylating the bound substrate amino acids. The inventive method allows conversion of the activation domains without N-methyl transferase activity to activation domains with N-methyl transferase activity while maintaining the original substrate specificity. It is thus possible to provide for every specificity of a given PPS module a corresponding module derivative with additional N-methyl transferase activity. These derivatives can be used to construct novel or modified PPS and the synthesized peptide is then N-methylated at the desired peptide bonds. The inventive method facilitates the synthesis of novel peptides with potential novel pharmacological properties.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 00/77220 A2



HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Veränderung von Peptidsynthetasen (PPS) in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. PPS sind Enzyme, die Peptide auf nicht-ribosomale Weise synthetisieren. Die von den PPS synthetisierten Peptide (oder die daraus hervorgehenden Derivate) sind oft von pharmazeutischem Interesse. Die PPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul besitzt eine Aktivierungsdomäne, welche die jeweilige Substrataminosäure erkennt und kovalent bindet. Die von der PPS katalysierte Peptidsynthese erfolgt dann durch die Kondensation der kovalent gebundenen Substrataminosäuren. Eine geringe Anzahl der bekannten Aktivierungsdomänen ist in der Lage, die gebundenen Substrataminosäuren auch zu N-methylieren. Die hier beschriebene Erfindung ermöglicht die Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität, wobei die ursprüngliche Substratspezifität erhalten bleibt. Für jede Spezifität eines vorhandenen PPS-Moduls kann somit ein entsprechendes Modul-Derivat mit zusätzlicher N-Methyltransferase-Aktivität bereitgestellt werden. Diese Derivate können dann dazu genutzt werden, neue oder modifizierte PPS zu konstruieren, wodurch das synthetisierte Peptid dann an den gewünschten Peptidbindungen N-methyliert ist. Dies ermöglicht die Synthese neuer Peptide mit möglichen neuen pharmakologischen Eigenschaften.

Verfahren zur Veränderung von Peptidsynthetasen in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Veränderung von Peptidsynthetasen (PPS) in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. Dies wird durch eine gezielte Modifikation oder Austausch der funktionellen Untereinheiten (Aktivierungsdomänen) dieser Enzyme erreicht.

Peptidsynthetasen (PPS) sind Enzyme, die Peptide auf nicht-ribosomale Weise synthetisieren. Die von den PPS synthetisierten Peptide (oder die daraus hervorgehenden Derivate) sind oft von pharmazeutischem Interesse, wie beispielsweise die Penicilline, Vancomycin, Cephalosporin, Pristinamycin oder das Actinomycin D. Die PPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul einer PPS erkennt, aktiviert und bindet jeweils eine Aminosäure. Einige PPS-Module akzeptieren auch ungewöhnliche (nicht proteinogene) Aminosäuren als Substrate, wie beispielsweise die alpha-Aminoadipinsäure (in Penicillin) oder das Phenylglycin (in Pristinamycin). Die von der PPS katalysierte Synthese eines Peptides erfolgt durch die enzymkatalysierte Kondensation der an den Modulen gebundenen Aminosäuren. Diese Kondensation ist gerichtet, und zwar in der Weise, daß die am ersten Modul der PPS (bezogen auf den N-Terminus der PPS) gebundene Substrataminosäure den Anfang (N-Terminus) des synthetisierten Peptids bildet. Somit bestimmt die Anzahl und die Reihenfolge der Module innerhalb einer PPS die Länge und die Sequenz des synthetisierten Peptides (Kleinkauf H., von Döhren H. (1990) Eur. J. Biochem. 192:1-15). Dies ist von entscheidender Bedeutung, da bei einem Austausch bzw. dem Einfügen oder Deletieren von PPS-Modulen auf genetischem Wege die Struktur des danach gebildeten Produkts vorhersagbar ist.

Allen bekannten PPS-Modulen ist gemeinsam, daß sie sich aus mindestens drei funktionellen Domänen zusammensetzen (Abbildung 1A). Diese drei Domänen sind (1) die Adenylierungs-Domäne, notwendig für die Erkennung und Adenylierung der Substrataminosäure, und (2) die ACP-Domäne, notwendig für die kovalente Bindung der adenylierten Aminosäure in Form eines Thioesters und (3) die Kondensationsdomäne, notwendig zur Kondensation aller an der PPS gebundenen Aminosäuren zum synthetisierten Peptid (Stachelhaus *et al.* (1995) FEMS Microbiol. Lett. 125:3-14). Die Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne werden zusammen auch als Aktivierungsdomäne bezeichnet (Abbildung 1A), da sie zusammen die Erkennung und kovalente Bindung der Substrataminosäure in Form eines reaktiven Thioesters ermöglichen. Eine besondere Gruppe bilden jene Aktivierungsdomänen, die ihre Substrataminosäuren nach der kovalenten Bindung auch N-methylieren können. Bei PPS mit solchen Aktivierungsdomänen enthält folglich das bei der nachfolgenden Kondensation entstehende Peptid auch N-methylierte Aminosäuren. Die Zahl der zur Zeit bekannten bzw. klonierten Gene kodierend für Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität (11 Domänen) ist jedoch deutlich geringer als die Zahl der Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität (über 80

Domänen). Zudem zeigen viele der Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität eine vergleichbare Substrataktivität, wie z.B. für die Aminosäure Valin in den Modulen der Actinomycin Synthetase II aus *Streptomyces chrysomallus* (Schauwecker et al. (1998) J. Bacteriol. 180 : 2468-2474), der Cyclosporin Synthetase aus *Tolypocladium niveum* (Weber et al. (1994) Cur. Genet. 26:120-125) und der Enniatin Synthetase aus *Fusarium scirpi* (Haese et al. (1993) Mol. Microbiol. 7:905-914).

Die hier beschriebene Erfindung ist deshalb von Bedeutung, da sie auch die Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität beschreibt, wobei die ursprüngliche Aminosäure-Substratspezifität erhalten bleibt. Für jede Spezifität eines vorhandenen PPS-Moduls kann somit ein entsprechendes Modul-Derivat mit zusätzlicher N-Methyltransferase-Aktivität bereitgestellt werden. Diese Derivate können dann dazu genutzt werden, neue oder modifizierte PPS zu konstruieren, wodurch das von der PPS synthetisierte Peptid an den gewünschten Peptidbindungen N-methyliert ist. Dies ermöglicht die Synthese neuer Peptide mit möglichen, neuen pharmakologischen Eigenschaften. Viele der bereits bekannten pharmakologisch aktiven Peptide und Peptid-Derivate, wie beispielsweise das Cyclosporin, enthalten N-methylierte Aminosäuren. Die durch die Erfindung erreichbare, selektive N-Methylierung einzelner Stickstoffatome in den Peptidbindungen von Polypeptiden, ist durch chemische Methoden kaum oder nicht möglich.

Die Erfindung basiert darauf, daß alle Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität eine zusätzliche Domäne besitzen, welche zwischen der Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne lokalisiert ist (Abbildung 1 B). Diese zusätzliche Domäne wird im Weiteren als N-Methyltransferase-Domäne bezeichnet und vermittelt die N-Methylierung der gebundenen Substrataminosäure. Die Erfindung beinhaltet Verfahren zur Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität und deren Nutzung zur Neukonstruktion von PPS für die Synthese von N-methylierten Aminosäuren und Peptiden. Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität einer PPS können prinzipiell durch zwei Wege in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität überführt werden:

(1) Ein ganzes Modul oder die ganze Aktivierungsdomäne einer PPS wird ausgetauscht. Dieses Verfahren ist in Beispiel 2 beschrieben.

(2) Eine N-Methyltransferase-Domäne wird als funktionelle Einheit in eine Aktivierungsdomäne inseriert. Die N-Methyltransferase-Domäne kann beispielsweise direkt zwischen die Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne der umzuwandelnden Aktivierungsdomäne inseriert werden (Abbildung 2 A). Zur Insertion können auch zwei dicht benachbarte Fusionsstellen genutzt werden. Hierbei wird der zwischen den Fusionsstellen liegende Bereich in der umzuwandelnden Aktivierungsdomäne deletiert und durch entsprechende Bereiche ersetzt, die zusammen mit der N-Methyltransferase-Domäne inseriert werden (Abbildung 2 B). Dieses Verfahren ist in Beispiel 3 beschrieben. Bei der Verwendung von

zwei Fusionsstellen kann die N-Methyltransferase-Domäne auch als Block mit einer nachfolgenden ACP-Domäne (oder Teilen davon) hinter die Aktivierungsdomäne inseriert werden, wodurch es zu einem Austausch der ursprünglichen ACP-Domäne durch die inserierte ACP-Domäne (bzw. Teilen davon) kommt (Abbildung 2C und 2D). Bei allen Insertionen bleibt die Substratspezifität der umgewandelten Aktivierungsdomäne aber erhalten, da die Adenylierungs-Domäne (Erkennung und Adenylierung der Substrataminosäure) nicht verändert wird.

Geeignete Insertionsstellen für die Insertion der N-Methyltransferase-Domäne in eine Aktivierungsdomäne werden durch den Übergang zwischen Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne festgelegt. Diese ergeben sich aus dem Sequenzvergleich zwischen Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Domäne und Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Domäne (Abbildung 3). Die N-Methyltransferase-Domänen liegen als Einschub etwa 45 Aminosäuren hinter (C-terminal) der als „core motif 5“ bekannten Konsensussequenz QVKIRG(F/H/Y)RIE(L/I)GEIE (Turgay *et al.* (1992) Mol. Microbiol. 6:529-546) der Adenylierungs-Domäne und unmittelbar N-terminal zur Konsensussequenz (Q/E/D) (I/V) REx (V/L) xxxLPXYM(V/I) P.

Alle beschriebenen Methoden zur Umwandlungen einer Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität in eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität oder deren Verwendung zur Konstruktion neuer PPS beinhalten eine gezielte Veränderung und Kombination der entsprechenden DNA-Abschnitte von Peptidsynthetase Genen. Hierzu wird der DNA-Abschnitt, welcher für die N-Methyltransferase-Domäne einer beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodiert, in das DNA-Segment, welches für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, eingefügt. Dies muß in einer Weise geschehen, daß sich nach der Insertion ein gemeinsamer Leserahmen bildet und die kodierte N-Methyltransferase-Domäne integraler Bestandteil der kodierten Aktivierungsdomäne wird. Hierfür kann beispielsweise das DNA-Fragment aus einem Gen einer PPS, welches komplett oder teilweise für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, in Plasmiden kloniert werden. Zur Klonierung und Modifikation von DNA können alle gängigen Methoden der Molekularbiologie verwendet werden, wie beispielsweise die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Klonierungen und DNA-Manipulationen können in allen für diese Zwecke geeigneten Plasmiden und Organismen, wie beispielsweise pUC-Plasmiden und *E.coli*, erfolgen. Bei der Klonierung und Modifikation der DNA können bereits vorhandene oder beispielsweise durch PCR erzeugte Restriktionsschnittstellen genutzt werden. Solche Verfahren sind in Beispiel 1 beschrieben und beinhalten die Einführung einer Restriktionsschnittstelle in die DNA des Gens der Actinomycin Synthetase II. welche dann zum nachfolgenden Modulaustausch genutzt wird.

Durch die Insertion eines für die N-Methyltransferase-Domäne kodierenden DNA-Segments in das Gensegment einer PPS können neue PPS konstruiert werden. Die Expression eines neuen PPS-Gens kann in Plasmiden erfolgen und zur Synthese neuer Produkte führen. Dies ist in Beispiel 4 beschrieben und beinhaltet die Expression eines rekombinanten PPS-Gens nach der

Transformation eines entsprechenden Plasmids in *Streptomyces lividans* und den Nachweis der katalytischen Aktivität der von dem PPS-Gen kodierten PPS. Auch können DNA-Segmente dazu genutzt werden, PPS-Gene in das Genom von Organismen einzuführen oder bereits im Genom vorhandene PPS-Gene zu verändern, wie beispielsweise gezeigt beim Gen der Surfactin Synthetase in *Bacillus subtilis* (Stachelhaus *et al.* (1995) Science 269(5220):69-72). Entsprechend können daher auch Module mit N-Methyltransferase-Aktivität in genomische PPS-Gene eingebracht werden und zur Bildung neuer, N-methylierter Peptide führen.

Beispiele

Im Folgenden wird das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung anhand von Beispielen näher beschrieben.

Die bei der Durchführung der Beispiele verwendeten Plasmide (pSP72, pBlueScript, pIJ702, pSPIJ004 und pACM5) sind in Abbildung 4 schematisch gezeigt und in Tabelle 1 näher erläutert.

Die DNA-Sequenzen der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die in den Beispielen angegebenen Größen der PCR-Fragmente beziehen sich auf PCR-Fragmente, deren Enden mit den in den Beispielen genannten Restriktionsenzymen geschnitten wurden. Zusätzliche Restriktionsschnittstellen in den Oligonukleotiden wurden genutzt, um die PCR-Fragmente vor den in den Beispielen geschilderten Klonierungen zuerst in *E.coli*-Standardplasmiden zu klonieren.

Die DNA-Sequenz des Gens der Actinomycin Synthetase II (*acmB*) ist in der Datenbank „GenBank“ unter dem Eintrag AF047717 abgelegt. Die DNA-Sequenz eines 3849 bp *BamHI*-Fragments aus dem Gen der Actinomycin Synthetase III (*acmC*) ist den Beispielen nachfolgend beigelegt.

Beispiel 1

Einführen einer Restriktionsschnittstelle in das Gen der Actinomycin Synthetase II, um einen Austausch einer Aktivierungsdomäne zu ermöglichen.

Die Actinomycin Synthetase II (ACMS II) aus *Streptomyces chrysomallus* besitzt zwei Module ohne N-Methyltransferase-Domäne, von denen Modul 1 die Aminosäure Threonin und Modul 2 die Aminosäure Valin aktiviert. Um die Aktivierungsdomäne von Modul 2 austauschen zu können, wurde durch Mutagenese eine *EcoRI*-Schnittstelle in das Gen der ACMS II (*acmB*) eingeführt. Diese *EcoRI*-Schnittstelle und eine bereits im Gen vorhandene *Clal*-Schnittstelle ermöglichen es, den für die Aktivierungsdomäne von Modul 2 kodierenden Bereich durch beliebige *Clal*-

EcoRV-Fragmente auszutauschen. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

Zur Erzeugung einer *EcoRV*-Restriktionschnittstelle in das Gen der ACMS II (*acmB*) wurde das Plasmid pACM5 genutzt (Abbildung 4; Schauwecker *et al.* (1998) J. Bacteriol., 180:2468-2474). Das Plasmid pACM5 (Abbildung 4) trägt das *acmB*-Gen hinter einem konstitutiven Streptomyceten Promotor (*mel P*) und ist ein Derivat des Streptomyceten-Plasmids pIJ702. Durch PCR-Mutagenese und entsprechende Klonierungen wurde eine *EcoRV*-Schnittstelle in das *acmB*-Gen hinter den für die Phosphopantethein-Bindungsstelle kodierenden Bereich (in Modul 2) an Basenpaar (bp) Position (Pos.) 6251 eingeführt:

			V	R	D	V	F	E
15	<i>acmB</i> wildtyp	(bp 6244-6262) :	5'-	gtccggg	<u>acgt</u>	tcttcgag		
				(bp	Pos. 6251)			
			V	R	D	I	F	E
20	<i>acmB</i> mutagenisiert	(bp 6244-6262) :	5'-	gtccggg	<u>atata</u>	tcttcgag		
					<i>EcoRV</i>			
				(bp	Pos. 6251)			

2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

Zuerst wurde ein 4923 bp *PstI*-*ClaI*-Fragment, welches den *mel*-Promotor und den größten Teil des 5'-gelegenen Bereichs der *acmB* umfaßt (bis zur *ClaI*-Schnittstelle an bp Pos. 4519 in *acmB*) aus pACM5 isoliert und in das *E. coli* Plasmid pSP72 kloniert (A in Abbildung 5). Danach wurde ein Teil des direkt anschließenden 3'-Bereiches der *acmB* (beginnend mit der *ClaI*-Schnittstelle an bp 4519) mit den Oligonukleotiden *prim-A* und *prim-B* durch PCR amplifiziert (PCR-Fragment 1 in Abbildung 5) und als 1737 bp *ClaI*-*EcoRV*-Fragment eingefügt (B in Abbildung 5). Die durch *prim-B* eingeführte *EcoRV*-Schnittstelle entspricht bp Pos. 6251 in *acmB*. Die zusammengesetzten Fragmente wurden dann als komplettes *PstI*-*EcoRV*-Fragment isoliert und in pBlueScript umklontiert (C in Abbildung 5). Hieraus kann dann der zusammengesetzte 5'-Bereich der *acmB* zur späteren Klonierung als *BamHI*-*EcoRV*-Fragment isoliert werden. Der noch fehlende 3'-Bereich der *acmB* wurde mit den Oligonukleotiden *prim-C* und *prim-D* amplifiziert (PCR-Fragment 2 in Abbildung 5) und als 2583 bp *EcoRV*-*BamHI*-Fragment in pSP72 kloniert (D in Abbildung 5). Das erhaltene Plasmid wurde mit *BglII* und *EcoRV* geschnitten und der 5'-Bereich der *acmB* (isoliert als *BamHI*-*EcoRV*-Fragment wie oben beschrieben) eingesetzt. Dies ergibt Plasmid pACM00-A (Abbildung 5), welches das vollständig zusammengesetzte *acmB* Gen mit der an bp Pos. 6251 eingeführten *EcoRV*-Schnittstelle trägt.

Beispiel 2

Austausch einer vollständigen Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität durch eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität in einer PPS.

Der Austausch einer vollständigen Aktivierungsdomäne wurde in der Actinomycin Synthetase II (ACMS II) aus *Streptomyces chrysomallus* vorgenommen. Die Aktivierungsdomäne von Modul 2 wurde durch eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität ausgetauscht. Die zum Austausch verwendete Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität stammt aus der Actinomycin Synthetase III (ACMS III) und ist ebenfalls spezifisch für Valin. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

Der Bereich zwischen einer in *acmB* liegenden *ClaI*-Schnittstelle an bp Pos. 4519 und einer an bp Pos. 6251 eingeführten *EcoRV*-Schnittstelle (in Plasmid pACM00-A aus Beispiel 1), welcher für die zweite Aktivierungsdomäne der ACMS II kodiert, wurde deletiert und durch ein mit PCR generiertes 2961 bp *ClaI*-*EcoRV*-Fragment ersetzt, welches für eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität der ACMS III mit Spezifität für Valin kodiert. Die Bereiche an den Fusionsstellen (*ClaI* und *EcoRV*) kodieren für in beiden PPS konservierte Regionen, welche N-terminal und C-terminal zu den Aktivierungsdomänen lokalisiert sind. Nach der Insertion des PCR-generierten *ClaI*-*EcoRV*-Fragments in das modifizierte *acmB* Gen entsteht wieder ein durchgehender Leserahmen, welcher für eine rekombinante ACMS II kodiert:

25 modifizierte
ACMS II
(in Plasmid pACM00-A)

30 Aktivierungsdomäne
aus der ACMS II
(2961 bp PCR-Fragment)

35 rekombinante
ACMS II
(in Plasmid pACM00-B)

40

S R I D V L T S V R D I F E
.. agccgtatcgatgtctctcacc.....tccggtccgggacgtctctcgag ..
Claf EcoRV
(bp Pos. 4591) (bp Pos. 6251)

V L T G L R
atcgatGTCTCTCACC.....GGCCTGCGCGgatatc
Claf EcoRV

S R I D V L T G L R D I F E
.. agccgtatcgatGTCTCTCACC.....GGCCTGCGCGgatatctctcgag ..
Claf EcoRV
(bp Pos. 4591) (bp Pos. 7480)

Das Gen der rekombinanten ACMS II (in Plasmid pACM00-B, Abbildung 7) wurde in *Streptomyces lividans* transformiert und die enzymatische Aktivität der eingeführten Aktivierungsdomäne nach der Expression des PPS-Gens wie in Beispiel 4 beschrieben nachgewiesen.

2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

Von einem 3849 bp *Bam*HI-Fragment aus dem Gen der ACMS III (*acmC*, die Sequenz ist beigefügt), welches für eine Valin-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Domäne kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden *prim-E* und *prim-F* durch PCR ein 2967 bp *Cla*I-*Eco*RV-Fragment amplifiziert (PCR-Fragment 4 in Abbildung 6). Dieses *Cla*I-*Eco*RV-Fragment wurde in das Plasmid pACM00-A (aus Beispiel 1) kloniert und hierdurch das ursprünglich in pACM00-A vorhandene *Cla*I-*Eco*RV-Fragment ausgetauscht. Das erhaltene Plasmid wurde mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und der Streptomyceten-Anteil aus Plasmid pSPIJ004 (Abbildung 4) als 5130 bp *Bgl*II-*Hind*III-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht das Plasmid pACM00-B (Abbildung 7), welches sowohl in *E. coli* als auch in Streptomyceten transformiert und selektioniert werden kann.

Beispiel 3

Umwandlung einer Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität in eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität und Einbringen dieser umgewandelten Aktivierungsdomäne in eine PPS.

In die Valin-Aktivierungsdomäne aus Modul 2 der ACMS II wurde zwischen die Adenylierungs-Domäne und die ACP-Domäne eine zusätzliche N-Methyltransferase-Domäne inseriert. Hierdurch wird die Aktivierungsdomäne der ACMS II mit einer zusätzlichen N-Methyltransferase-Aktivität versehen. Die eingesetzte N-Methyltransferase-Domäne stammt aus Modul 3 der ACMS III. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

Zur geplanten Insertion der N-Methyltransferase-Domäne wurden zuerst zwei *Sna*BI-Schnittstellen im Gen der *acmB* an bp Pos. 5899 und bp Pos. 5932 durch PCR-Mutagenese eingeführt. Anschließend wurde der zwischen den beiden *Sna*BI-Schnittstellen liegende Bereich von 33 bp deletiert und durch ein 1263 bp *Eco*RV-*Eco*RV-Fragment, welches für die oben genannte N-Methyltransferasedomäne der ACMS III kodiert, ersetzt. Die Ligation der *Sna*BI-Enden mit den *Eco*RV-Enden führt zur Bildung einer mit diesen beiden Restriktionsenzymen nicht mehr spaltbaren DNA-Sequenz an den Fusionsstellen. Nach der Insertion des PCR-generierten *Eco*RV-*Eco*RV-Fragments entsteht bei einer der beiden möglichen Orientierungen wieder ein durchgehender Leserahmen, welcher für eine rekombinante ACMS II kodiert:

40	ACMS II	<p>R L V A Y V V A D G G T A P D G L R E A L</p> <p>.. cgctcgtcgccctacgtcgtcgcggaacggcgcccggaacggcggtctcgcgagggccctc ..</p> <p>(bp Pos. 5899) (bp Pos. 5932)</p>
45	modifizierte ACMS II	<p>R L V A Y V R E A L</p> <p>.. cgctcgtcgccctacgttagtcgcggaacggcgcccggaactacgtacgcgagggccctc ..</p> <p><i>Sna</i>BI <i>Sna</i>BI</p> <p>(bp Pos. 5899) (bp Pos. 5932)</p>

N-Methylierungs-Domäne
aus der ACMS II-
(1263 bp PCR-Fragment)

I V A D L L T D
gatATCGTCGCGGAC.....CTGCTCACCgATatc
EcoRV *EcoRV*

rekombinante R L V A Y I V A D L L T D V R E A L
ACMS II .. cgcctcgtegcctacATCGTCGCGGAC.....CTGCTCACCgATgtacgcgagccctc ..
(in Plasmid pACM00-C) (bp Pos. 5899) (bp Pos. 7156)

Das Gen der rekombinanten ACMS II (in Plasmid pACM00-C, Abbildung 7) wurde in *Streptomyces lividans* transformiert und die neu eingeführte N-Methyltransferase-Aktivität der rekombinanten PPS wie in Beispiel 4 beschrieben nachgewiesen.

2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

Zur Einführung der *SnaBI*-Schnittstellen wurden der Bereich des *acmB*-Gens von bp Pos. 4591 bis 5899 mit den Oligonukleotiden *prim-G* und *prim-H* (PCR-Fragment 1 in Abbildung 6) sowie der Bereich von bp Pos. 5932 bis 6251 mit den Oligonukleotiden *prim-I* und *prim-J* (PCR-Fragment 2 in Abbildung 6) durch PCR amplifiziert. Danach wurde zuerst das PCR-Fragment 2 als 330 bp *HindIII-EcoRV*-Fragment in pBlueScript kloniert und dann das PCR-Fragment 1 als 1386 bp *ClaI-SnaBI*-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht ein DNA-Fragment, welches für die fast vollständige Aktivierungsdomäne von Modul 2 der ACMS II kodiert und in welches eine *SnaBI*-Schnittstelle eingeführt wurde (A in Abbildung 6). In diese *SnaBI*-Schnittstelle wurde anschließend ein 1263 bp *EcoRV-EcoRV*-Fragment eingesetzt, welches von einem 3849 *BamHI*-Fragment aus dem Gen der ACMS III (*acmC*, die Sequenz ist beigefügt) durch PCR mit den Oligonukleotiden *prim-K* und *prim-L* amplifiziert wurde (PCR-Fragment 3 in Abbildung 6). Die Orientierung des inserierten *EcoRV-EcoRV*-Fragments, welches für die N-Methyltransferase-Domäne der ACMS III kodiert, wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Durch die Fusion der *EcoRV*-Enden mit den *SnaBI*-Enden konnte die zusammengesetzte Aktivierungsdomäne dann komplett als 2961 bp *ClaI-EcoRV*-Fragment isoliert werden und wurde in das Plasmid pACM00-A (aus Beispiel 1) kloniert und hierdurch das ursprünglich in pACM00-A vorhandene *ClaI-EcoRV*-Fragment ausgetauscht. Das erhaltene Plasmid wurde mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten und der Streptomyceten-Anteil aus Plasmid pSPIJ004 (Abbildung 4) als 5130 bp *BglII-HindIII*-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht das Plasmid pACM00-C (Abbildung 7), welches sowohl in *E. coli* als auch in Streptomyceten transformiert und selektioniert werden kann.

Beispiel 4

Expression rekombinanter PPS mit eingeführter N-Methyltransferase-Domäne und *in vitro* Testung ihrer N-Methyltransferase-Aktivität.

Zur Expression der in den Beispielen 2 und 3 konstruierten PPS-Gene wurden die dort beschriebenen Plasmide pACM00-B und pACM00-C (Abbildung 7) in *Streptomyces lividans*

(Stamm TK64) transformiert. Die Transformation sowie die mikrobielle Kultivierung von Streptomycceten erfolgte nach Standardprotokollen (Hopwood *et al.* (1985) Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England). Die Reinigung der plasmidkodierten PPS aus den Transformanten erfolgte jeweils aus 1 Liter YEME Kulturmedium nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase (3 Tage Wachstum). Die
5 Reinigung der PPS auf einen für die Analyse notwendigen Reinheitsgrad beruht im wesentlichen auf einem bereits detailliert beschriebenen Protokoll (Schauwecker *et al.* (1998) J. Bacteriol. 180:2468-2474) und wird deshalb im Folgenden nur schematisch erläutert: Zur Freisetzung von Proteinen wurden die Zellen mechanisch aufgebrochen (French-Press). Die ebenfalls
10 freigesetzte genomische DNA wurde durch eine Inkubation mit DNase I gespalten um eine dünnflüssige Suspension zu erhalten. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und Proteine anschließend durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 55% gefällt. Die gefällten Proteine wurden durch eine
15 Ausschlußchromatographie (Säulenmatrix: Ultrogel-AcA-34 von Biosepra) nach Größe aufgetrennt. Proteinfractionen mit Proteinen einer Größe von mehr als 200 kDa wurden vereinigt und weiter über einen Anionenaustauscher (Säulenmatrix: Q-Sepharose FF von Pharmacia) aufgereinigt. Die an den Anionenaustauscher gebundenen Proteine wurden durch kontinuierliche Zugabe von NaCl vom Anionenaustauscher freigesetzt. Die in den Beispielen 2 und 3 konstruierten PPS eluierten in einem Bereich zwischen 150 bis 250 mM NaCl. Die nach diesem
20 Protokoll partiell gereinigten PPS können dann beispielsweise nach folgenden Vorschriften weiter analysiert werden:

Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der spezifischen Erkennung und Bindung von Aminosäuren an eine PPS:

25 100 µl angereinigte PPS werden mit mit 3 µl ¹⁴C-markierter Substrataminosäure (100 µCi/ml), 2 µl MgCl₂ (1 M) und 15 µl ATP (0,1 M) gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die PPS wird durch Zugabe von 2 ml 7% Trichloressigsäure (TCA) gefällt, mit 10 ml 5% TCA gewaschen und die am Enzym gebundene Menge der Substrataminosäure durch Messen der Radioaktivität
30 bestimmt.

Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der durch eine PPS katalysierte N-Methylierung von Aminosäuren :

35 Zum Nachweis der N-Methylierungs-Aktivität wird die PPS wie oben beschrieben mit ¹⁴C-markierter Substrataminosäure inkubiert, dem Ansatz aber noch zusätzlich 3 µl 0,1 M S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Donor für die auf die Aminosäure übertragene Methylgruppe zugesetzt. Nach der TCA-Fällung wird die PPS mit 4 ml 5% TCA (zwei Portionen) und danach mit 2 ml Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Durch Zugabe von 300 µl
40 Perameisensäure und einer Inkubation für 6 Stunden bei 20 °C wird die als Thioester gebundene Substrataminosäure freigesetzt. Der Ansatz wird anschließend im Vakuum bis zur Trockene

eingengt. Die Aminosäure wird durch Zugabe von 40 µl Ameisensäure gelöst und die Umwandlung in die N-methylierte Form beispielsweise durch chromatographische Methoden nachgewiesen. Für die Umwandlung von Valin in N-Methyl-Valin kann beispielsweise folgendermaßen verfahren werden: 20 µl von der PPS freigesetzten (¹⁴C-markierte) Aminosäure wird parallel mit 5 µl der entsprechenden Referenzen (0,1 M Valin und 0,5 M N-Methyl-Valin) auf einer Kieselgel 60 DC-Folie (Merck) mit dem Laufmittel n-Butanol:Essigsäure:H₂O (Volumen 80:20:20) chromatographiert. Die Aminosäuren werden durch eine Ninhydrinreaktion, und einem Autoradiogramm für die ¹⁴C-markierte Substrataminosäure, sichtbar gemacht.

10 Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der durch eine PPS katalysierten Bildung von Peptiden:

Grundsätzlich kann ein Peptid durch saure Hydrolyse und anschließendem Nachweis der einzelnen Aminosäurekomponenten auf einfachem Wege analysiert werden. Dies trifft besonders auf Peptide zu, welche durch PPS gebildet werden, da die Aminosäuresequenz des synthetisierten Peptids durch die Anordnung der Module bereits bekannt ist. Durch den Einsatz von ¹⁴C-markierten Aminosäuren kann die Analyse des *in vitro* gebildeten Peptids beispielsweise wie folgt durchgeführt werden: 100 µl angereinigte PPS wird mit allen Substrataminosäuren der PPS (jeweils 2 mM), SAM (2 mM), ATP (10 mM) und MgCl₂ (20 mM) in einem Gesamtvolumen von 150 µl für 25 min bei 30°C inkubiert. Gegebenenfalls können der Inkubation auch weitere Enzyme, welche mit der zu testenden PPS zusammenarbeiten, zugesetzt werden (Pfennig *et al.* (1999) JBC 274: 12508-12515). Es werden mehrere Inkubationen parallel angesetzt, wobei sich die Zahl der Ansätze nach der Anzahl der Module in der PPS richtet und in jedem Ansatz die dem Modul entsprechende Aminosäure ¹⁴C-markiert eingesetzt wird. Aus jedem Ansatz wird die PPS wie oben beschrieben mit TCA gefällt, das Syntheseprodukt mit Performsäure abgespalten und das gebildete Peptid nach dem Einengen in Ethanol:Wasser (Volumen 1:1) gelöst und durch chromatographische Methoden nachgewiesen. Zum Nachweis der Threonyl-N-methyl-Valin Peptidverknüpfung durch die in Beispiel 2 und 3 konstruierte PPS kann beispielsweise folgendermaßen verfahren werden: 20 µl des von der PPS freigesetzten Peptids aus jedem Ansatz (ein Ansatz mit ¹⁴C-markiertem Threonin und ein Ansatz mit ¹⁴C-markiertem Valin) werden auf einer Kieselgel 60 DC-Folie (Merk) mit dem Laufmittel n-Butanol:Eisessig:H₂O (Volumen 80:20:20) chromatographiert. Die bei beiden Ansätzen entstehenden Produkte mit identischem R_f-Wert werden durch Extraktion mit Ethanol:Wasser (Volumen 1:1) isoliert, im Vakuum eingengt und die Aminosäuren durch saure Hydrolyse (6 N HCl, 110°C, 20h) aus den Peptiden freigesetzt. Die Identifikation der freigesetzten ¹⁴C-markierten Aminosäuren erfolgt durch erneute Chromatographie auf DC-60 Platten mit dem gleichen Laufmittel. Hierdurch können die Komponenten Threonin und N-Methyl-Valin im gebildeten Peptid nachgewiesen werden. Besteht ferner die Möglichkeit, ein Referenz-Peptid auf chemischen Weg zu synthetisieren, kann dieses direkt mit dem enzymatisch gebildeten und ¹⁴C-markierten Peptid verglichen werden, beispielsweise durch HPLC mit einer zur Trennung von Peptiden geeigneten Säule wie der SuperPac Pep-5 - Säule von Pharmacia.

Tab llen und Abbildungen

Tabelle 1

Verwendete Ausgangsplasmide zur Durchführung der Beispiele

Plasmid	Quelle oder Literaturzitat	Selektion	Beschreibung
pSP72	Promega	Amp	Kommerzieller Klonierungsvektor für <i>E.coli</i> .
pBlueScript	Stratagene	Amp	Kommerzieller Klonierungsvektor für <i>E.coli</i>
pIJ702	Katz <i>et al.</i> (1983) J. Gen. Microbiol. 129 : 2703-2714	Tsr	Weit verbreiteter Klonierungsvektor für Streptomyceten. Er trägt die Melanin (<i>mel</i>) Gene <i>melC1</i> und <i>melC2</i> unter Kontrolle ihres Promotors (<i>mel P</i>).
pSPIJ004	Eigenentwicklung	Amp Tsr	Das Plasmid ist eine Kombination aus pSP72 und pIJ702 und ist sowohl in <i>E.coli</i> als auch in Streptomyceten replizierbar. Hierzu wurde das <i>PstI</i> - <i>BglII</i> -Fragment aus pIJ702 in den Polylinker von pSP72 kloniert.
pACM5	Schauwecker <i>et al.</i> (1998) J. Bacteriol. 180 : 2468-2474	Tsr	Das Plasmid ist ein pIJ702-Derivat und trägt das Gen der Actinomycin Synthetase II (<i>acmB</i>) unter Kontrolle des <i>mel</i> -Promotors.

Abkürzungen: Tsr = Thiostrepton; Amp = Ampicillin;

Tabell 2

Bei den Beispielen verwendete PCR-Oligonukleotide

Oligonukleotid	DNA-Sequenz und Restriktionsschnittstellen
<i>prim</i> - A	5'- gccggaattccgtatcgatgtcctcaccgccgaggaga <i>EcoRI</i> <i>Clal</i>
<i>prim</i> - B	5'- tgcggaattcgaagatatcccgacggagaaaccgat <i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i>
<i>prim</i> - C	5'- tctccgtccgggatattcttcgagcagcgcacg <i>EcoRV</i>
<i>prim</i> - D	5'- atggcctgagttgctggatcctggcgatcccga <i>BamHI</i>
<i>prim</i> - E	5'- ctcagccgcacatcgatgtcctca <i>Clal</i>
<i>prim</i> - F	5'- cgcctcgaagatatcgcgaggccca <i>EcoRV</i>
<i>prim</i> - G	5'- gcaggaattcagccgtatcgatgtcctca <i>EcoRI</i> <i>Clal</i>
<i>prim</i> - H	5'- ttccggaattcgcgactacgtaggcgacga <i>EcoRI</i> <i>SnaBI</i>
<i>prim</i> - I	5'- cggccaagctttacgtacgcgaggccctccggcggcgccct <i>HindIII</i> <i>SnaBI</i>
<i>prim</i> - J	5'- tgcggaattcgaagatatcccgacggagaaaccgat <i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i>

Nukleotidsequenz d s bei der Durchführung der B ispi l v rwend ten *Bam*HI-Fragm nts aus dem *acmC* - Gen

5

Nukleotidsequenz:

Nummerierung:
der Basenpaare

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

GGATCCACCT	GCTCGACACC	GCCACCGCCC	AACCCGAGCA	GCCCCCTCAGC	CGCATCGACG	0000000060
TCCTCACCCC	GGAGGAGAGG	AACCGCACGA	TCGTGAGAGT	CAACCGGACC	GAACCTGCCG	0000000120
TGCCCGACGC	CTCGTTGGCG	GAGCTGTTTC	AACAACAGGT	GACCCTCACA	CCCGACGCC	0000000180
CCGCCCTGGT	CAGCGACGGC	GCCACGCTCA	GCTACTCCGA	GCTCAACACG	CGCGCCAACC	0000000240
ACCTCGCCCA	CCAGCTCACC	ACCCGGGGCA	TCCGCCCCGG	CGACGCCGTC	GCCGTCCTCC	0000000300
TCCAACGCTC	CCCGACACC	GTCACCACCG	TCCTCGCCCT	CGCCAAGACC	GGCGGACCT	0000000360
ACATCCCCCT	CGACAGCCGC	TACCCCGCCG	ACCCTACCG	CCTCGTCCTC	GACGAGACCC	0000000420
GCACCAAACT	CCTCATCACC	GACCACACCA	CCGACCTCGA	CACCACCACA	ACCCAGTTCA	0000000480
ACCCCGCCGA	CACCCCCAC	GACGGCGAAG	ACCCCGGCAA	CCCGAACACC	ACCACCCACC	0000000540
CCGACGACGC	CGCTACATC	ATGTACACCA	CCGGCTCCAC	CGGCCGCCCC	AAGGGCGTCA	0000000600
TGCCACCCCA	CCGCAACATC	ACCGCCCTCG	CCCTCGACCC	CCGCTTGCAC	CCCACGCCCC	0000000660
ACCGCCCGGT	CCTCCTCCAC	TCCCCCACCG	CCTTCGACGC	CTCCACCTAC	GAGATCTGGG	0000000720
TCCCCCTCCT	CAACGGCAAC	ACCGTCTGCC	TGCCCCCCAC	CGGCGACCTC	GACGTCACCA	0000000780
CCTACCAACG	CGTCATCACC	GACCAGCAGA	TCACCGCCCT	CTGGGTGACC	AGCTGGGTCT	0000000840
TCAACCTCCT	CACCGAGCAG	AGCCCGGAGA	CCTTCACCCG	GGTCCGGCAG	ATCTGGACCG	0000000900
GGCGCGAGGC	CGTCTCCGGC	GCCACCGTCA	CCCGGCTTCA	GCAGGCATGC	CCCGACACCA	0000000960
CCGTGGTCTGA	CGGTACGGC	CCACACGAGT	CCGACCCCTT	CGCCACCCAC	CACCCCGTCC	0000001020
CCACCCCTTA	CACCGGCTCC	GCCGTCTGCC	CCATCGGCCG	CCCCATGGCC	ACCATGCACA	0000001080
CCTACGTGCT	CGACGACAGC	CTCCAGCCCG	TGCCCCCCGG	CGTCACCGGC	GAGCTCTACC	0000001140
TCGTGGCAG	CGGCTCTGCC	CGCGGCTACC	TGGACCGCCC	CGCCCTCACC	GCCGAACGCT	0000001200
TCGTGCGCAA	CCCGTACGCC	GCACCCGGAG	AACGATGTA	CCGCACCGGC	GACCTGGCAC	0000001260
GCTGGAACTC	CGACGACCAC	CTCGAGTACG	CCGGCCGCGC	CGACCAACAG	GTCAAGGTCC	0000001320
GGGGCTTCCG	CATCGAACCC	GGCGAGATCG	AGAAGCTCCT	CACCGACCAT	CCCGCCGTCC	0000001380
CCGAGGCCGC	CGTCCACCTC	AACCGGGACC	AGCCCGGCAA	CCCCCGGCTC	GTGCGGTACG	0000001440
TCGTGCGGGA	CACCTCGGCG	CCGAGCAGCG	ATGTGGACCA	GCAGCACCAG	ATCGGCGAGT	0000001500
GGCAGGACCT	CTACGACTCC	CTTACGCGG	CCCCACGGC	CGAGTTCGGC	GAGGACTTCT	0000001560
CCGGCTGGAA	CAGCAGCTAC	GACGGCCGGC	CGATCCCCCT	CGACCAGATG	CGGGAGTGGC	0000001620
GCAGCGCCAC	CGTGGAAACG	ATCCGCGGCC	TCAACCCGCG	CCGGGTGCTG	GAGATCGGCG	0000001680
TCGGCACGGG	CCTGCTGCTC	GCGAAGCTGG	CCCCCGAGTG	CGAGGAGTAC	TGGGGCACGG	0000001740
ACCTCTCGCC	CACCGTGATC	GAGGCGCTCT	CCCGCCACGT	CGACGCGGAC	CCGGAGCTGG	0000001800
CCCGCGGGGT	CACCTCGCGG	GCCGCTGCCG	CGCACGAGCA	CGAGGGGCTG	CCCGTCCGCC	0000001860
ACTTCGACAC	CGTGTGCTC	AACTCCGTGG	TCCAGTACTT	CCCGAACGCC	GACTACCTCG	0000001920
CCGAGGTCAT	CGAGCAGGCG	CTGCGGCTGC	TGGCCCCCGG	CGGCGCGGTG	TTCATCGGCG	0000001980
ACATCGCAA	CCCGCGGCTG	CTGCGCACCT	TCACCACCGC	CGTCCAGACC	GCCCGCGCGG	0000002040
AGGACCCGGC	CGACACCGCC	GCCGTGCGGC	GCGCCGTCGA	GCAGAGCCTG	GTGCTGGAGA	0000002100
AGGAACCTCG	GCTCGACCCG	GAGTACTTCA	CCCGGCTCAC	CCACCGCCTC	CCGGACCTCG	0000002160
CCGGCGTCTGA	CCTGCGGCTC	AAGTGGGGCG	CCGCCACAA	CGAGTTGACC	CGCTACCGCT	0000002220
ACGACACCA	GCTCCACAAG	GCCGGAATCA	CCCGCTCCC	GCTGTCCGAG	GCCGCGGTCC	0000002280
TGGGCTGGCC	GAGGACGCGC	GAGGCACTCG	CCCGGACCT	GGCCGAGGCC	CGGCCGAGC	0000002340
GGCTGCGCGT	CACCGGCGCG	CCCAACTCCC	GGATAGCCGC	CGACCTCGCG	GCCCGACAGC	0000002400
CCCTGGAGTC	CGGCACCGCC	CCGGCCGGGC	CCCCGACCGG	GCCCTACGCC	ACGGAGCAGC	0000002460
CGGACCTCGA	GGCACTCCAC	CGCCTCGGGG	AGGACACCGG	GTAAGGAGC	GCCGCTACCT	0000002520
GGTCCGCCCA	CCGCCCGGAC	ACCCTCGACC	TCACCTTCGT	CCGGCGCGGC	CTGCTCGACG	0000002580
GCGCGGTCCC	GGTCCGTACG	TACGCCCCCG	CGGCCCGCGG	CGACCCGGCG	ACGCCGCTCA	0000002640
CCGCCTTCAC	CACCAACCCC	GTCGGCAGCC	GGGGCACCGC	CGCGCTGCTC	ACCGCGCTGC	0000002700
GCGAACACGC	CGCCGCCCAA	CTGCCCGACT	ACATCGGGCC	CGCCGCAATC	GTCCCGCTCG	0000002760
ACCGCCTGCC	GCTCACCGCC	AACGGCAAGC	TCGACCGGGC	CGCCCTCCCG	GCACTCGACC	0000002820
CGGAGCACGC	GGACACCGGC	CGGCCCCCAA	GGACGCGGCA	GGAGCAGGTG	GTCTGCGAGC	0000002880
TGTTCCGCGA	GGTGCTCGGC	CGGCCGCTCG	TCGGTGTGGA	CCAGGACTTC	TTCGACCTCG	0000002940
GCGGGCACTC	GCTGCTCGCC	ACCCGGCTGA	TCGCCCGGCT	GCGCGCGGCC	TTCGGCGTGG	0000003000
AACTGGGGCT	GCGCAGCCTC	TTCGAGGGCG	CGACGCGGGG	CGGGATCGCC	GCCCGGCTGG	0000003060
ACCTCGACGA	CCCGGACGGC	TCCTACGAGG	TGGTGCTGCC	GCTGCGCGCC	CAGGGCAGCA	0000003120
GGCCGCGCGT	GTTCTGCATC	CACCCCGGTG	GCGGCATCAG	CTGGTCTGAC	AGCGCGCTGA	0000003180
TCAAGCACCT	CGGCCCGGAG	TACCCGCTGT	ACGGCATCCA	GGCGCGCAGC	CTGGCCCGCC	0000003240
CGGAGCCGCG	GCCGAGAGC	ATCGAGGAGA	TGGCGGTGGA	CTACGCGGAC	CAGATCCAGG	0000003300
GCGTGCAGCC	GCACGGCCCC	TACCACTGG	CCGGTGTGTC	GTTCCGCGGG	CTGTGCGCCC	0000003360
ATGCCCTGGC	CGCGGAGTTC	CAGCGGCGCG	GCGAGCCGGT	GGCGCTGGTC	GCGGTGCTCG	0000003420
ATGTGATCCC	GAAGTGGCAG	GGGCTCACCC	ACGACGACGT	CCCGCCCCC	GACGACCGGG	0000003480
TGATGCTGCT	GTACCACTGC	GGCCTGGTCG	ACGACGCGAG	CCACCGCAAC	GACCGCGAAG	0000003540
AGCTGACCTT	CGCCAGGGCC	CGCGAGATCC	TGCGCCGCCA	GGGCAGTGTG	CTGCCCAACC	0000003600
TGGAGGAGGA	CGCGCTCACC	ACGATCAGCC	AGATCTCGGC	CAACAACACC	CATCTGACCG	0000003660
TCGACTACCA	GCCCGGCCCG	ATCGACGGCG	ACCTGCTGCT	GATCGCCGCC	TCGGAACAGC	0000003720
AGGACCCGCC	GGTCACCGCC	GATGCCTGGC	GGCCGTACGT	CTGCGGCGCG	GTGAGGGCCC	0000003780
ACGTGGTGCC	CGCGGAGCAC	GGCTCCATGC	TGACCCGGCC	CGGCACCTTG	GCCGAGATCG	0000003840
GCCGGATCC						0000 03849

Abbildung 1: zeigt den schematischen, modularen Aufbau von PPS und die Unterteilung in funktionelle Domänen.

5 Abbildung 2: zeigt die Modifikation von Aktivierungsdomänen durch Insertion einer N-Methyltransferase-Domäne.

Abbildung 3: zeigt den Sequenzvergleich von ausgewählten Aktivierungsdomänen im Bereich der Übergänge zu N-Methyltransferase-Domänen.

10

Abbildung 4: zeigt die in den Beispielen verwendeten Ausgangsplasmide.

Abbildung 5: zeigt die Einführung einer *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle in *acmB*.

15 Abbildung 6: zeigt die Klonierung von *ClaI-EcoRV*-Kassetten für die Konstruktion rekombinanter *acmB*-Gene.

Abbildung 7: zeigt Plasmide zur Expression der rekombinanten PPS-Gene.

20

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Einführung von N-Methyltransferase-Domänen in PPS-Aktivierungsdomänen durch gezielte Veränderung und Kombination der entsprechenden DNA-Abschnitte von Polypeptidsynthetase-Genen, dadurch gekennzeichnet, daß man einen für die N-Methyltransferase-Aktivität einer beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodierenden DNA-Abschnitt als integralen Bestandteil in ein DNA-Segment, das für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, einfügt oder dieses DNA-Segment insgesamt gegen einen beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodierenden DNA-Abschnitt austauscht.

15

2. Verfahren zur Herstellung von Polypeptidsynthetasen mit N-Methyltransferase-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß man in Polypeptidsynthetase-Genen einen für die N-Methyltransferase-Aktivität einer beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodierenden DNA-Abschnitt als integralen Bestandteil in ein DNA-Segment, das für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, einfügt oder dieses DNA-Segment insgesamt gegen einen beliebigen Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodierenden DNA-Abschnitt austauscht, das neue Gen in geeigneten Systemen transformiert und die rekombinante Polypeptidsynthetase exprimiert.

25

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das für die N-Methyltransferase-Domäne kodierende DNA-Fragment zusammen mit DNA-Linker-Sequenzen inseriert wird.

30

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Insertion der DNA-Sequenz, welche für eine N-Methyltransferase-Domäne kodiert, gleichzeitig auch DNA-Sequenzen verändert werden, welche für die ACP-Domäne oder Aktivierungs-Domäne oder Kondensationsdomäne kodieren.

5. Verwendung der nach Anspruch 1 und den Ansprüchen 3-4 hergestellten DNA-Sequenzen für die Veränderung natürlicher PPS-Gene, bereits veränderter PPS-Gene oder Teilen davon, sowie die Verwendung zur Neukonstruktion von PPS-Genen oder Teilen davon.

5

6. Verwendung der nach Anspruch 1 und den Ansprüchen 3-5 hergestellten DNA-Sequenzen für die Veränderung natürlicher Gene von Polyketidsynthetasen (PKS), bereits veränderten PKS-Genen oder Teilen davon, sowie die Verwendung zur Neukonstruktion von PKS-Genen oder Teilen davon.

10

7. Verwendung der nach Anspruch 1 und den Ansprüchen 3-6 hergestellten DNA-Sequenzen für die Konstruktion von Plasmiden und genetisch veränderten Organismen zur Synthese der durch die DNA-Sequenzen kodierten Proteine.

15

8. Verwendung der nach Anspruch 7 hergestellten Proteine zur enzymatischen *in vivo* und *in vitro* Synthese von Aminosäuren, Polypeptiden und Peptidyl-Acetyl-Mischstrukturen, welche N-methylierte Aminosäuren oder deren Derivate enthalten.

20

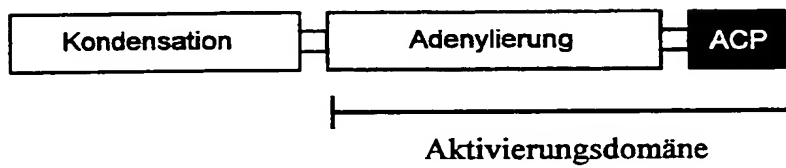
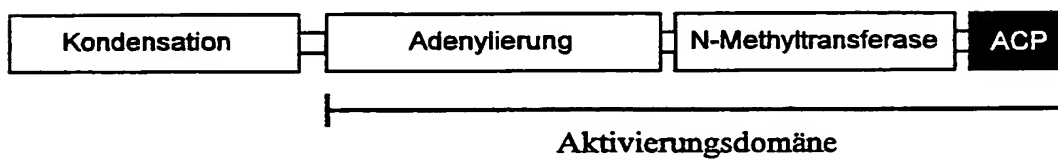
9. Verwendung der nach Anspruch 7 hergestellten Proteine zur fermentativen Synthese von Aminosäuren, Polypeptiden und Peptidyl-Acetyl-Mischstrukturen, welche N-methylierte Aminosäuren oder deren Derivate enthalten, wobei die Fermentation sowohl mit als auch ohne Zufütterung von Aminosäuren, Acetaten oder anderen organischen Zwischenprodukten erfolgen kann.

25

10. Polypeptidsynthetasen, deren Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität ganz oder teilweise in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität umgewandelt worden sind.

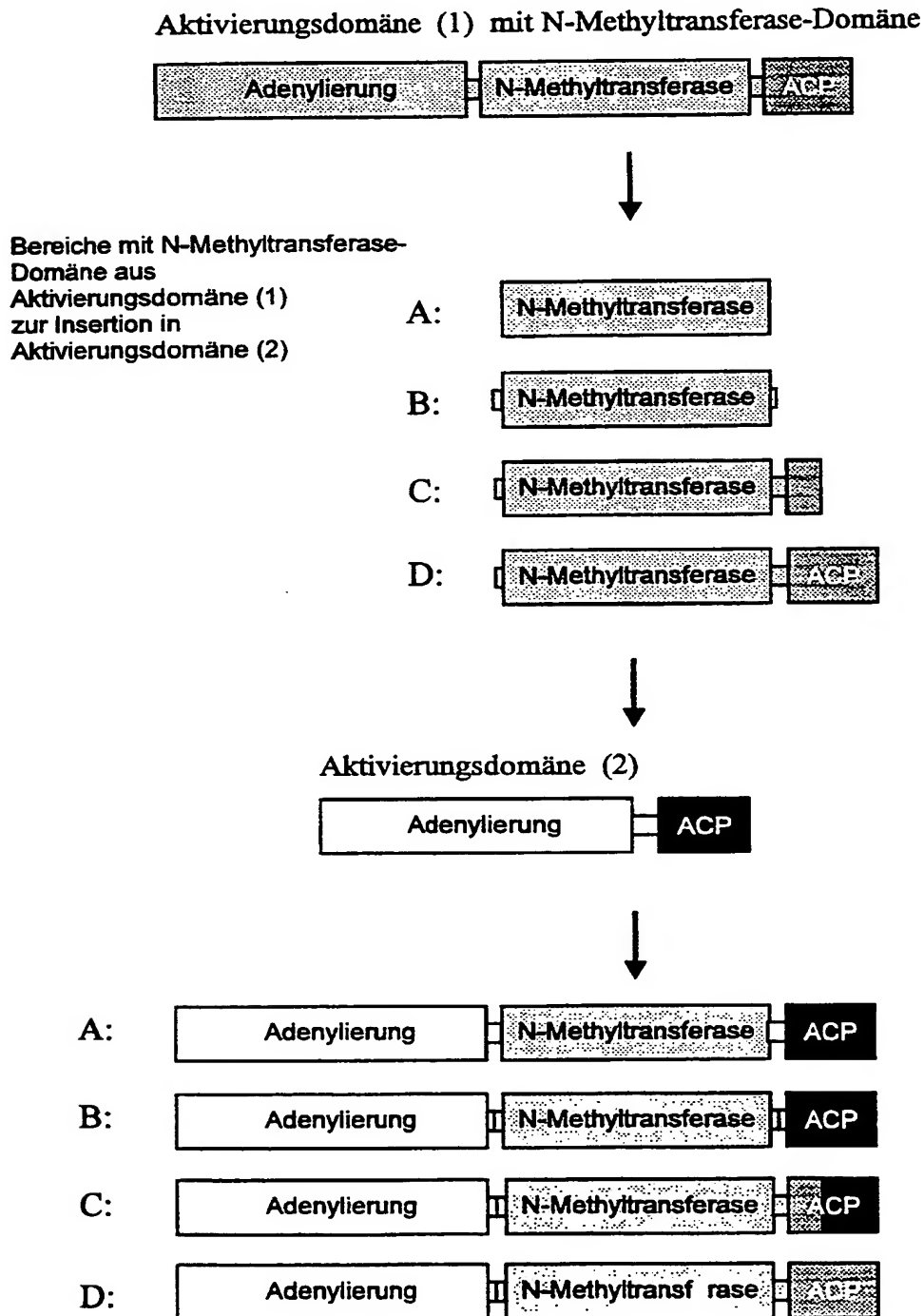
30

35

Abbildung 1: Modul einer PPS und Unterteilung in funktionelle Domänen**A: Minimal-Modul einer PPS****B: Modul mit N-Methyltransferase-Domäne**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

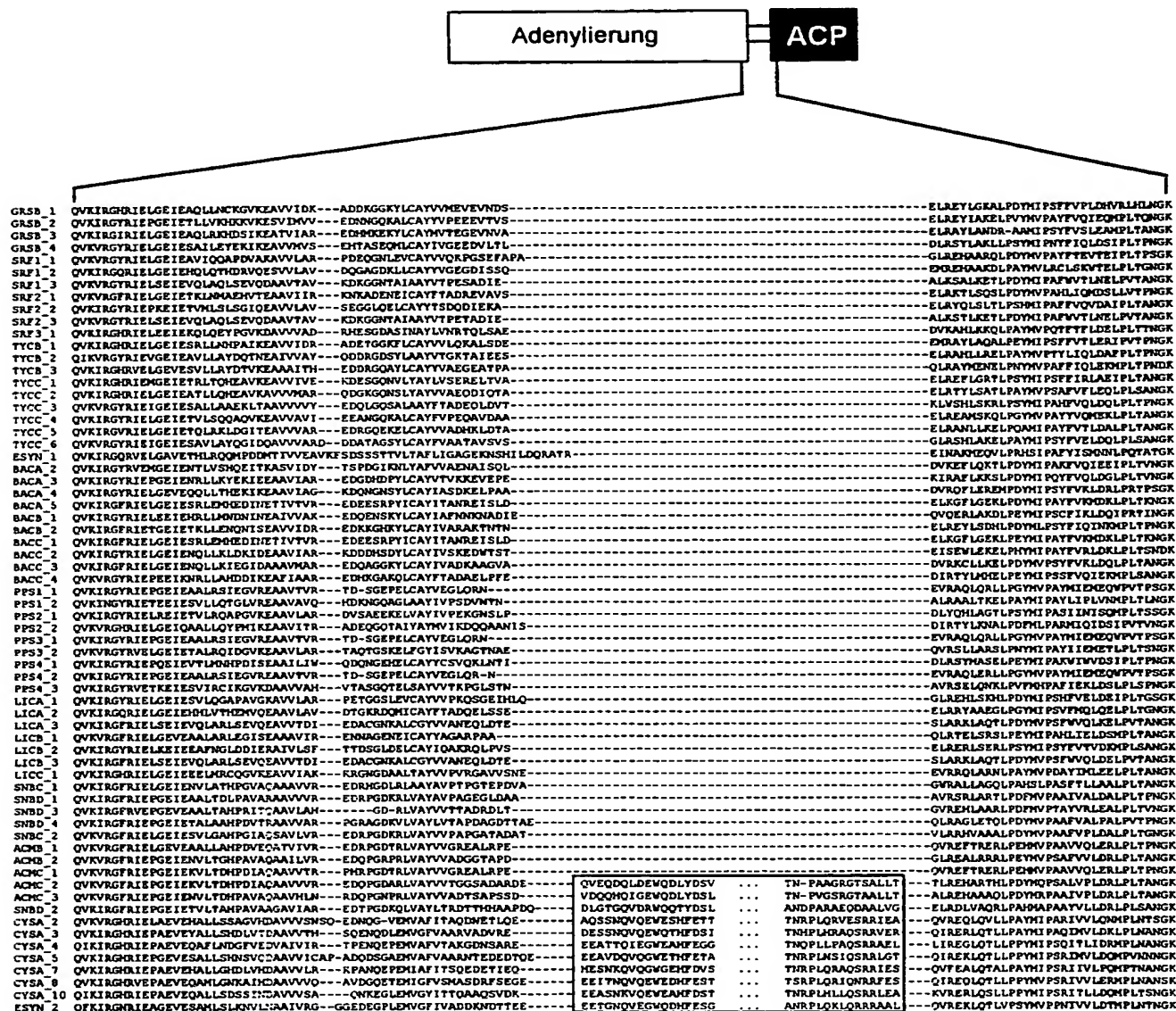
Abbildung 2: Umwandlung von Aktivierungsdomänen durch Insertion einer N-Methyltransferase-Domäne



Rekombinant Aktivierungsdomänen mit Spezifität von Aktivierungsdomän (2) und N-Methyltransferase-Aktivität

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 3: Sequenzvergleich von ausgewählten Aktivierungsdomänen im Bereich der Übergänge zu N-Methyltransferase-Domänen.



core motif 5

N-Methyltransferase-Domänen

(Sequenzausschnitt an den N-terminalen und C-terminalen Enden der Domänen)

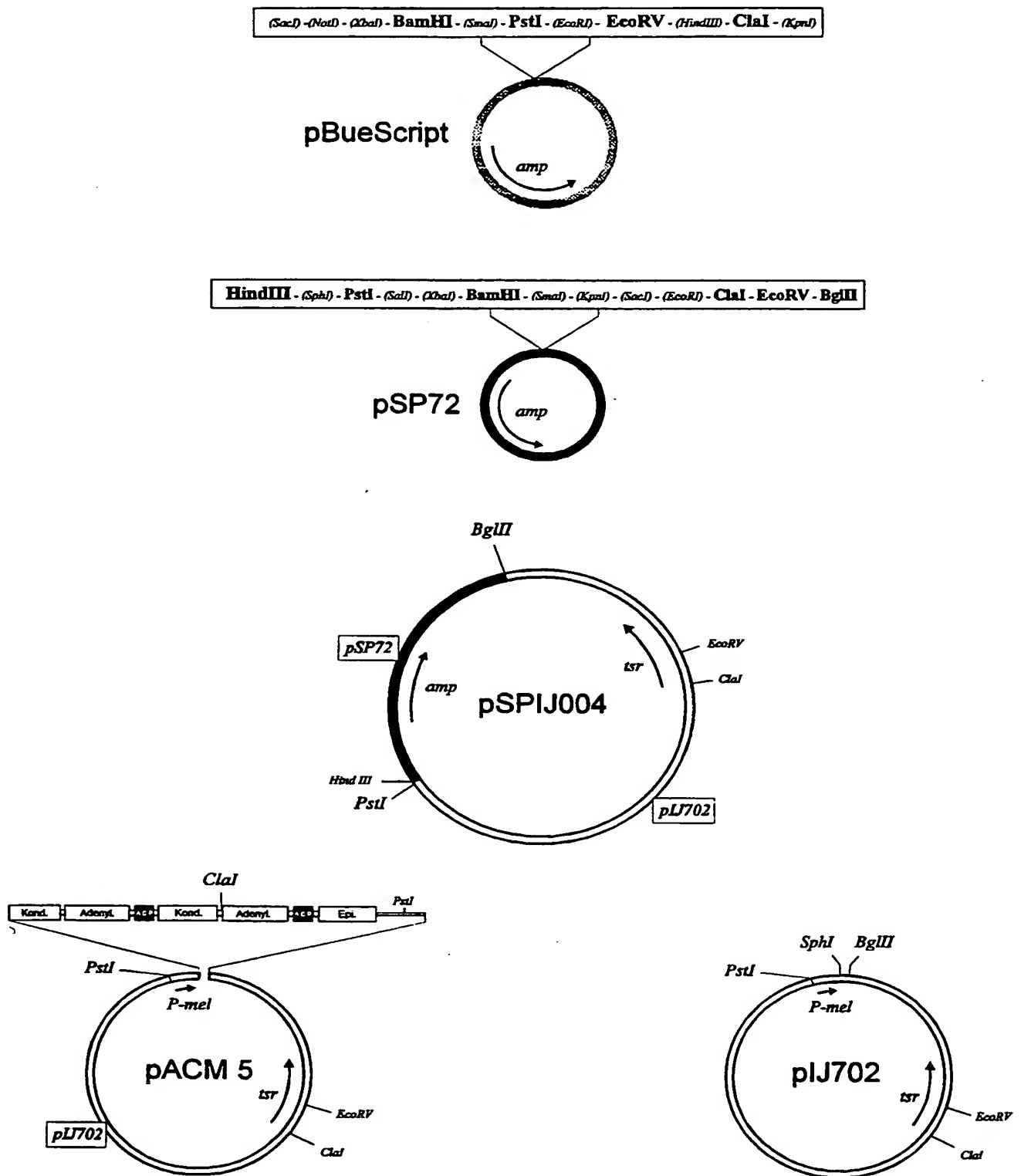
Konsensus am Übergang:

QIRExVxxxLPxYMVP
EV L I
D

CYS A	Cyclosporine Synthetase aus <i>Tolypocladium niveum</i> (Z28383)
GRS A,B	Gramicidin S Synthetase I,II aus <i>Bacillus brevis</i> (P14687 / P14688)
ACM,B,C	Actinomycin Synthetase II,III aus <i>Streptomyces chrysomallus</i> (AF047717 und beiliegende Sequenz)
BAC A,B,C	Bacitracin Synthetase A,B,C aus <i>Bacillus licheniformis</i> (AF007865)
TYC A,B,C	Tyrocidin Synthetase I,II,III aus <i>Bacillus brevis</i> (AF004835)
LIC A,B,C	Lichenysin Synthetase A,B,C aus <i>Bacillus licheniformis</i> (U95370)
ESYN	Erniatin Synthetase aus <i>Fusarium scirpi</i> (Z18755 : Update Jahr 2000)
SNB C,D	Pristinamycin I Synthetase C,D aus <i>Streptomyces pristinaespiralis</i> (Q54959, X98690)
SRF 1,2,3	Surfactin Synthetase 1,2,3 aus <i>Bacillus subtilis</i> (P27206, Q04747, Q08787)
PPS 1,2,3,4	Fengycin Synthetase 1,2,3,4 aus <i>Bacillus subtilis</i> (Z34883)

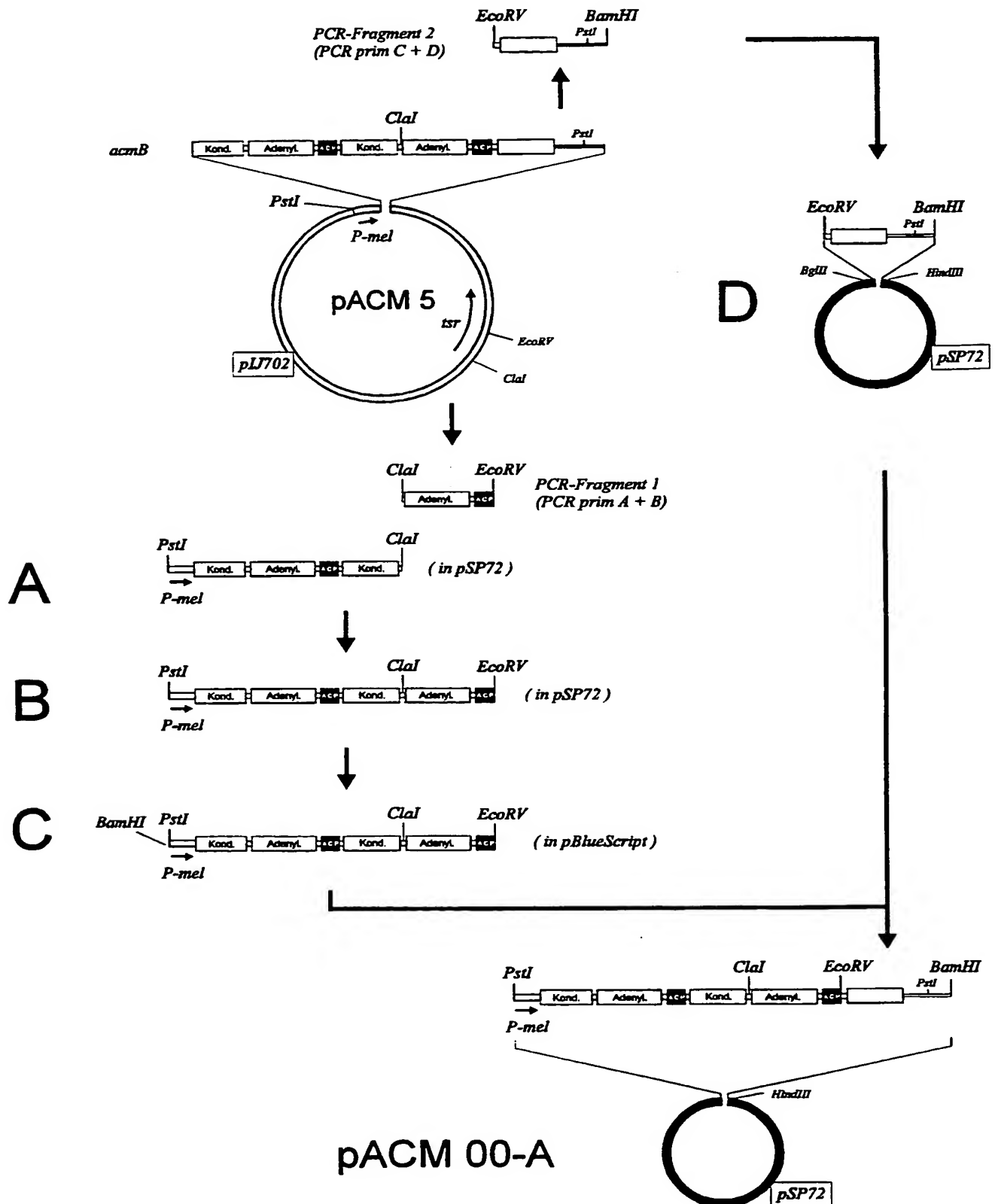
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 4: Ausgangsplasmide zur Konstruktion der Beispiele



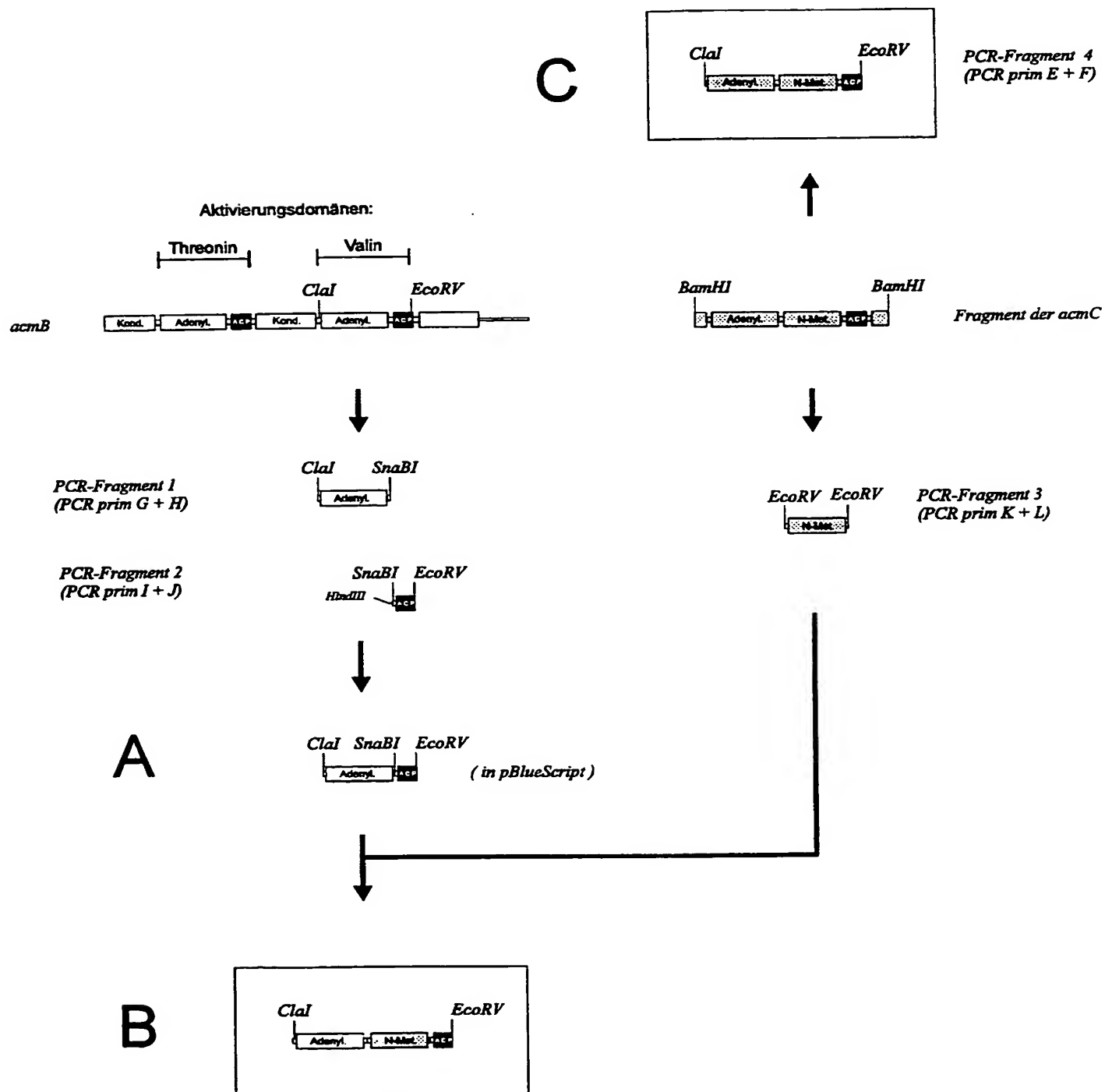
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 5 : Einführen einer *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle in *acmB*



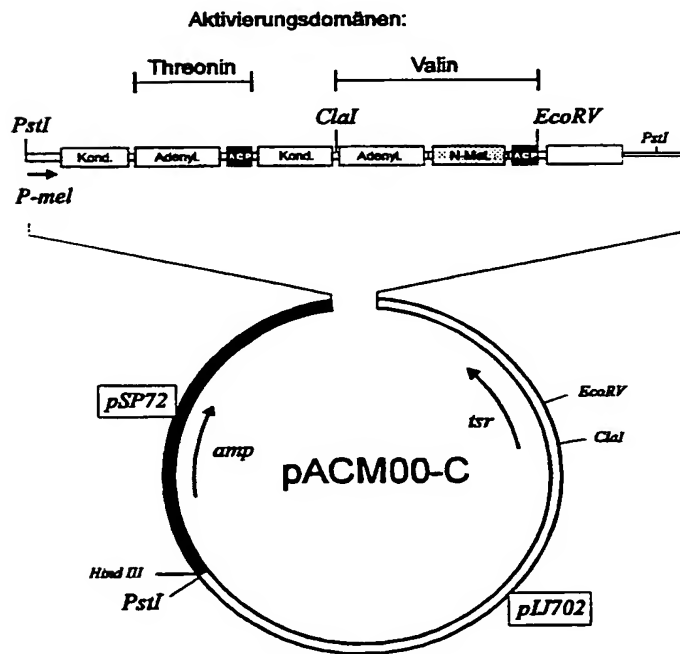
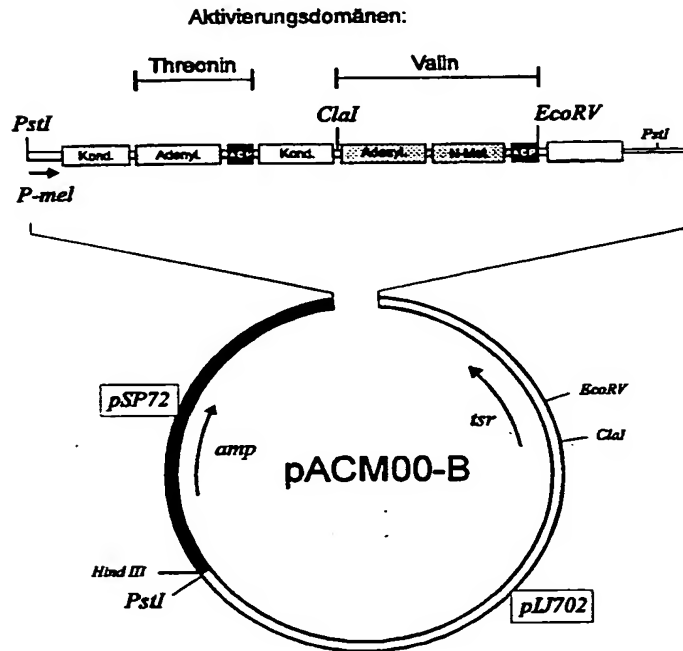
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 6 : Klonierung von *ClaI*-*EcoRV*-Kassetten für die Konstruktion rekombinanter *acmB*-Gene



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 7 : Plasmide zur Expression der rekombinanten PPS-Gene



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P 19887	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/01950	International filing date (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00)	Priority date (day/month/year) 16 June 1999 (16.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/52		
Applicant KELLER, Ullrich		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input checked="" type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 12 January 2001 (12.01.01)	Date of completion of this report 10 October 2001 (10.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01950

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-14 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____ 1-15 _____, filed with the letter of 13 September 2001 (13.09.2001)
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/7-7/7 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01950

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See separate sheet

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01950

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 5 (in part) 6, 12-15

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 12-14
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ the claims, or said claims Nos. 5 (in part) 6, 15 are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Claims 6, 12-15, and part of Claim 5 have not been subjected to preliminary examination for the following reasons:

Claims 6 and 15 are not supported by the description because their scope goes beyond that justified by the description and the drawings. Claim 6 necessarily leads to a doubling of ACP, activation, and condensation domains within a module. That feature, however, contradicts the disclosure of the description. Similarly, the specification mentions the features of Claim 15 exclusively in conjunction with polypeptide synthetases (PPS), rather than in conjunction with polyketide synthetases (PKS).

The amended Claims 12-14 go beyond the content of the version of the application as originally submitted because the very general terms "educt compound", "mixture" and "product compound" represent an inadmissible broadening of the originally disclosed subject matter (amino acids, polypeptides, peptidyl acetyl mixed structures, etc.).

The description only supports Claim 5 to the extent that it relates to the insertion of a domain with N-methyl transferase activity via two fusion points between adenylation and ACP domains. Therefore, Claim 5 has only partly been subjected to a preliminary examination, the subject matter of the claim having been interpreted in accordance with this restriction.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/01950

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.

The present examination is based on the assumption that all claims enjoy the priority rights from the filing date (16 June 1999) of the priority document.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-4, 10, 11 (completely); 5 (in part)	YES
	Claims	7-9	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-4, 10, 11 (completely); 5 (in part)	YES
	Claims	7-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-4, 7- 11 (completely); 5 (in part)	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**1. Reference is made to the following document:**

D1 = MARAHIEL M A ET AL: "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis", CHEMICAL REVIEWS, Vol. 97, No.7, November 1997, pages 2651-2673.

2. The present application concerns a process for changing non-ribosomal peptide synthetases (PPS), as a result of which they can N-methylate their substrate amino acids. For every amino acid of the peptide product, the modularly constructed PPS contains a substrate-specific activation domain. In addition, a few naturally occurring activation domains have N-methyl transferase activity. The transformation of an activation domain into an activation domain of the same substrate specificity with additional N-methyl transferase activity is done by inserting correspondingly coding DNA sequences into a PPS gene or via substitution of the activation domain. Also disclosed are the DNA obtainable according to this process, the cells containing this DNA, the use of such sequences to produce PPS, and proteins coded by these sequences.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3. Claims 7-9 are not consistent with **PCT Article 33(2)** because their subject matter is not novel. A product that is obtainable according to a particular process (here: DNA or a cell) is not novel simply because it has been produced by a novel process. However, because a DNA produced according to the disclosed process and coding for a PPS activation domain with N-methyl transferase activity and with a particular substrate-specificity cannot necessarily be differentiated from a DNA coding for a naturally occurring PPS activation domain with N-methyl transferase activity and with the same substrate-specificity, the subject matter of Claim 7 and, by analogy, also that of Claim 8 cannot be seen as novel. The same applies to Claim 9 because it logically also comprises the expression of naturally occurring PPS with N-methyl transferase activity in the corresponding organisms.

On the other hand, Claims 1-4, 5 (in part), and 10-11 satisfy the requirements of **PCT Article 33(2)** because the prior art neither discloses insertion of a domain with N-methyl transferase activity into the coding DNA sequence of a PPS activation domain without this activity nor does it disclose the targeted substitution of a PPS activation domain without N-methyl transferase activity through a corresponding domain with N-methyl transferase activity.

4. Document D1, which is considered to be the closest prior art for determining the presence of an inventive step in Claims 1-4, 5 (in part), and 10-11, discloses in addition to the modular organization of multifunctional PPS a plurality of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

strategies for constructing genetically modified PPS. The modules of a PPS each contain a plurality of domains that clearly act independently of each other, even if they are localized in a single protein (D2, page 2671, left-hand column, lines 28-37 and 48-56). Thus, the targeted substitution of one activation domain flanked by linkers by a different one leads to altered substrate specificity at that position (D2, Figure 11; page 2669, right-hand column, second paragraph). In modules with N-methyl transferase activity, both in the cyclosporin A-synthetase gene and in that of enniatin synthetase, conserved domains of approximately 420 amino acids were found that are localized between the adenylation and the thiol linking unit of these modules. An insertion of that kind within the activation domain correlates directly with a N-methylated amino acid in the peptide product (D2, Figures 3 and 4; page 2668, right-hand column, first paragraph).

Nonetheless, the available prior art documents make no direct reference to the fact that a N-methyl transferase activity can be precisely inserted in a module while maintaining the substrate specificity whether it be a) by inserting a N-methyl transferase domain into an activation domain or b) by substituting the entire activation domain. For that reason, Claims 1-4, 5 (in part), 10 and 11 satisfy the requirements of **PCT Article 33(3)**.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

5. The definition of the subject matter of Claims 1-5, 8, 9 and 10 is unclear under **PCT Article 6 for the following reasons:**

The use of the expression "DNA fragment" in Claims 1-5 hampers clearly defining them and is not suitable for determining the scope of these claims. Without an exact statement of the lengths and/or sequence of the elements cited, this expression remains vague and ambiguous. It is likewise impossible to precisely identify the PPS subunits (N-methylating domains, activation domains, etc.) in Claims 1-5 and 11. A DNA or gene or a protein must be considered as a chemical substance that should be defined in a claim only by reference to technical features, e.g., to its sequence, or exceptionally, as the product of a process and not by the mere statement of its function and/or the result sought.

The description makes clear (see page 3, lines 8-16 and Figure 2) that the position into which the N-methyl transferase domain is inserted is essential to the definition of the invention. Independent Claims 1-3 do not meet the requirements of **PCT Article 6** in conjunction with **PCT Rule 6.3(b)** according to which each independent claim must include all the technical features that are necessary for the definition of the invention. Hence, each of the independent claims must contain all of the technical features necessary for defining the invention.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

Contrary to **PCT Article 6**, Claim 8 is only partly supported by the description. The disclosure only suffices for cells originating from microorganisms but not for cells of other origin.

In Claim 9 the subject matter is not defined by a technical feature but by the result sought, i.e., in general through the expression of a DNA. The description (see page 3, line 18 to page 4, line 7) gives the impression that the expression of modified PPS can only be done in special organisms and that no alternatives are provided. Thus, contrary to **PCT Article 6**, the description does not support Claim 9.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts KeActinoPat1	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 01950	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 15/06/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/06/1999
Anmelder KELLER ,Ulrich.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbaren **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1



wie vom Anmelder vorgeschlagen



keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld III WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Auf Linie 1. nach "synthetisieren." streichen : "Die von" bis Linie 3.
"Interesse"

Auf Linie 10. nach "bleibt." bis Ende.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/52 C12N15/54 C12N15/62 C12N9/10 C12P13/04
C12P21/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 789 078 A (ENIRICERCH SPA) 13. August 1997 (1997-08-13) Seite 2, Zeile 27,28 Seite 3, Zeile 57-59 Ansprüche 1,3,4 ---	1-10
A	EP 0 637 630 A (ENIRICERCH SPA) 8. Februar 1995 (1995-02-08) Seite 4, Zeile 44 -Seite 5, Zeile 3; Abbildung 3 Anspruch 1 ---	1-10
A	EP 0 578 616 A (SANDOZ LTD ;SANDOZ AG (DE)) 12. Januar 1994 (1994-01-12) Seite 1, Zeile 13-16 Seite 4, Zeile 15-17; Beispiel 7 Ansprüche 12,13 --- -/-	1-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van de Kamp, M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 02659 A (STEMPFER GUENTHER ;BIOCHEMIE GMBH (AT); SCHOERGENDORFER KURT (AT);) 21. Januar 1999 (1999-01-21) Seite 6, Zeile 7-10 Ansprüche 1-3,5,6,10 ---	1-10
A	SCHNEIDER A ET AL: "Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 257, Nr. 3, Februar 1998 (1998-02), Seiten 308-318, XP002141778 Zusammenfassung ---	1-4
A	SCHAUWECKER F ET AL.: "Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from Streptomyces chrysomallus and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 180, Nr. 9, Mai 1998 (1998-05), Seiten 2468-2474, XP002153252 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1-4
A	KELLER U: "Actinomycin synthetases. Multifunctional enzymes responsible for the synthesis of the peptide chains of actinomycin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 262, Nr. 12, 25. April 1987 (1987-04-25), Seiten 5852-5856, XP002153253 Zusammenfassung ---	1-4
A	BURMESTER J ET AL: "Highly conserved N- methyltransferases as an integral part of peptide synthetases." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, Bd. 37, Nr. 2, Oktober 1995 (1995-10), Seiten 201-207, XP000965322 Zusammenfassung ---	1-10
A	BILLICH A ET AL.: "Formation of N-methylated peptide bonds in peptides and peptidols" BIOCHEM. PEPT. ANTIBIOT. (EDITOR(S): KLEINKAUF H; VON DOEHREN H.) PUBL: DE GRUYTER, BERLIN, FED. REP. GER. , 1990, Seiten 57-59, XP000965466 das ganze Dokument --- -/--	1-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MARAHIEL M A ET AL: "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis" CHEMICAL REVIEWS, Bd. 97, Nr. 7, November 1997 (1997-11), Seiten 2651-2673, XP002133489 Seite 2668, Absatz V.B Seite 2669, Absatz VI -Seite 2671, Absatz VII ---	1-10
P,X	SCHAUWECKER F ET AL.: "Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides" CHEMISTRY AND BIOLOGY, Bd. 7, Nr. 4, 20. März 2000 (2000-03-20), Seiten 287-297, XP000957461 das ganze Dokument -----	1-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IL 00/01950

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0789078	A	13-08-1997	IT MI951764 A	10-02-1997
			US 5795738 A	18-08-1998
EP 0637630	A	08-02-1995	IT 1264712 B	04-10-1996
			JP 7147978 A	13-06-1995
			US 5652116 A	29-07-1997
EP 0578616	A	12-01-1994	AT 398434 B	27-12-1994
			AT 398578 B	27-12-1994
			AT 43793 A	15-04-1994
			JP 6225773 A	16-08-1994
			US 5827706 A	27-10-1998
			AT 140392 A	15-05-1994
WO 9902659	A	21-01-1999	AU 8631198 A	08-02-1999
			EP 0994943 A	26-04-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01950

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C12N15/54 C12N15/62 C12N9/10 C12P13/04
C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 789 078 A (ENIRICERCHE SPA) 13 August 1997 (1997-08-13) page 2, line 27,28 page 3, line 57-59 claims 1,3,4 ---	1-10
A	EP 0 637 630 A (ENIRICERCHE SPA) 8 February 1995 (1995-02-08) page 4, line 44 -page 5, line 3; figure 3 claim 1 ---	1-10
A	EP 0 578 616 A (SANDOZ LTD ;SANDOZ AG (DE)) 12 January 1994 (1994-01-12) page 1, line 13-16 page 4, line 15-17; example 7 claims 12,13 --- -/--	1-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 2000

Date of mailing of the international search report

13/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van de Kamp, M

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 02659 A (STEMPFER GUENTHER ;BIOCHEMIE GMBH (AT); SCHOERGENDORFER KURT (AT);) 21 January 1999 (1999-01-21) page 6, line 7-10 claims 1-3,5,6,10 ---	1-10
A	SCHNEIDER A ET AL: "Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 257, no. 3, February 1998 (1998-02), pages 308-318, XP002141778 abstract ---	1-4
A	SCHAUWECKER F ET AL.: "Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from Streptomyces chrysomallus and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 180, no. 9, May 1998 (1998-05), pages 2468-2474, XP002153252 abstract; figure 1 ---	1-4
A	KELLER U: "Actinomycin synthetases. Multifunctional enzymes responsible for the synthesis of the peptide chains of actinomycin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 262, no. 12, 25 April 1987 (1987-04-25), pages 5852-5856, XP002153253 abstract ---	1-4
A	BURMESTER J ET AL: "Highly conserved N- methyltransferases as an integral part of peptide synthetases." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 37, no. 2, October 1995 (1995-10), pages 201-207, XP000965322 abstract ---	1-10
A	BILLICH A ET AL.: "Formation of N-methylated peptide bonds in peptides and peptidols" BIOCHEM. PEPT. ANTIBIOT. (EDITOR(S): KLEINKAUF H; VON DOEHREN H.) PUBL: DE GRUYTER, BERLIN, FED. REP. GER. , 1990, pages 57-59, XP000965466 the whole document ---	1-10

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 00/01950

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARAHIEL M A ET AL: "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis" CHEMICAL REVIEWS, vol. 97, no. 7, November 1997 (1997-11), pages 2651-2673, XP002133489 page 2668, paragraph V.B page 2669, paragraph VI -page 2671, paragraph VII	1-10
P,X	SCHAUWECKER F ET AL.: "Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides" CHEMISTRY AND BIOLOGY, vol. 7, no. 4, 20 March 2000 (2000-03-20), pages 287-297, XP000957461 the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01950

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0789078	A	13-08-1997	IT	MI951764 A	10-02-1997
			US	5795738 A	18-08-1998
EP 0637630	A	08-02-1995	IT	1264712 B	04-10-1996
			JP	7147978 A	13-06-1995
			US	5652116 A	29-07-1997
EP 0578616	A	12-01-1994	AT	398434 B	27-12-1994
			AT	398578 B	27-12-1994
			AT	43793 A	15-04-1994
			JP	6225773 A	16-08-1994
			US	5827706 A	27-10-1998
			AT	140392 A	15-05-1994
WO 9902659	A	21-01-1999	AU	8631198 A	08-02-1999
			EP	0994943 A	26-04-2000